



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

SHEILA DAYANNA MILAN UGARTE

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA COBERTURA COMESTÍVEL DE
QUITOSANA ADICIONADA COM TRANS-CINAMALDEÍDO SOBRE *Escherichia
coli* e *Listeria innocua* EM MELÃO CANTALOUPE (*Cucumis melo* L)
MINIMAMENTE PROCESSADO**

FORTALEZA

2012

SHEILA DAYANNA MILAN UGARTE

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA COBERTURA COMESTÍVEL DE
QUITOSANA ADICIONADA COM TRANS-CINAMALDEÍDO SOBRE *Escherichia
coli* e *Listeria innocua* EM MELÃO CANTALOUPE (*Cucumis melo* L)
MINIMAMENTE PROCESSADO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora:
Prof. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo

Coorientadora:
Prof. Dra. Isabella Montenegro Brasil

FORTALEZA

2012

SHEILA DAYANNA MILAN UGARTE

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA COBERTURA COMESTÍVEL DE
QUITOSANA ADICIONADA COM TRANS-CINAMALDEÍDO SOBRE *Escherichia
coli* e *Listeria innocua* EM MELÃO CANTALOUPE (*Cucumis melo* L)
MINIMAMENTE PROCESSADO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (DTA/CCA/UFC)

Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa
Universidade Federal do Ceará (DTA/CCA/UFC)

Dra. Terezinha Feitosa
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

FORTALEZA

2012

A Deus.

Ao meu Esposo, Eldin.

Aos meus pais, Gonzalo e Hortencia.

AGRADECIMENTOS

Ao povo e ao Governo do Brasil, que através do Programa de Estudantes Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG), vêm cooperando para o aperfeiçoamento de profissionais estrangeiros, de países em vias de desenvolvimento.

A professora Evânia Altina Teixeira de Figueiredo por ter aceitado me orientar nesta pesquisa, realizando o seu trabalho com profissionalismo, pela transmissão de conhecimentos, pelas indicações, conselhos prestados, pela atenção que me dispensou e, por ser não somente uma orientadora acadêmica, mas também uma amiga.

A professora Isabella Montenegro Brasil por toda ajuda prestada e pela transmissão de conhecimentos.

Ao Pesquisador Adroaldo Guimarães Rossetti, pela disponibilidade e auxílio prestado na parte experimental do trabalho, em particular no tratamento estatístico dos dados.

Aos membros da banca examinadora que aportaram muito na melhoria desta obra graças a sua experiência e minuciosa revisão: Dra. Terezinha Feitosa e Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa.

As minhas caras colegas: Flayanna, Marina, Gisani, Natalia, Alzira, Livia e a todos os membros do Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

Aos meus irmãos da Igreja Batista de Parquelândia, que cuidaram de nós (meu esposo e eu), fora da UFC e nos permitiram servir e crescer no caminho do Senhor ao seu lado.

À nossa família na Bolívia, que suportaram a nossa ausência com muita paciência e que nos apoiaram apesar das consequências e a distância.

Ao meu amado esposo Eldin, que me apoio e me ajuda em todo momento, dando-me seu amor e conselhos.

Soli Deo Gloria

RESUMO

O consumo de frutas minimamente processadas tem crescido consideravelmente nos últimos anos devido suas vantagens nutricionais e por estarem prontos para o consumo. Porém, a presença de microrganismos patogênicos nestes produtos é um risco para a saúde dos consumidores, pois são consumidos crus. O foco principal desta pesquisa foi avaliar *in vivo* a eficiência de uma cobertura de quitosana adicionada de trans-cinamaldeído em melão (*Cucumis melo* L.) minimamente processado, sobre a microbiota própria do melão e do melão inoculado com *Escherichia coli* (ATCC 25922TM) e *Listeria innocua* (ATCC 33090). Inicialmente determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida (CBM) do trans-cinamaldeído a nível *in vitro* para obter-se a concentração efetiva como antimicrobiano. Posteriormente, os melões foram minimamente processados e divididos em três partes, sendo uma sem inoculação, outra inoculada com *E. coli* e outra com *L. innocua*, sendo em seguida imersos em dois tipos de cobertura: cobertura de quitosana de médio peso molecular (2%) e em cobertura de quitosana de médio peso molecular (2%) com 0,05% de trans-cinamaldeído. Como controles foram utilizados o melão inoculado com água; inoculado com *E. coli* e inoculado com *L. innocua*. Foram realizadas determinação de bactérias mesófilas, psicrófilas, coliformes, bolores e leveduras nos melões não inoculados e contagem de *E. coli* e *L. innocua* nos melões inoculados, nos tempos: 0, 3, 7, 14 e 21 dias de armazenamento a 4 °C. Ambas coberturas apresentaram atividade antimicrobiana sobre *E. coli*, *L. innocua*, bactérias mesófilas, psicrófilas, coliformes, bolores e leveduras, não ocorrendo entre elas uma diferença estatística significativa ($P > 0,001$). A cobertura com trans-cinamaldeído não apresentou maior eficiência na ação antimicrobiana com relação aos microrganismos pesquisados.

Palavras chave – Melão minimamente processado. Coberturas comestíveis. Quitosana. Trans-cinamaldeído. Atividade antimicrobiana. *Listeria*. *Escherichia*.

ABSTRACT

The consumption of fresh-cut fruits have grown considerably in recent years due to its nutritional advantages and because these are ready-to-eat products. However, the potential presence of pathogenic microorganisms in these products is a health risk for consumers, as they are eaten raw. The main purpose of this research was to evaluate *in vivo* the efficiency of a chitosan edible coating added with trans-cinnamaldehyde applied to fresh-cut melon (*Cucumis melo* L.), against fresh-cut melon's own microflora and against *Escherichia coli* (ATCC 25922TM) and *Listeria innocua* (ATCC 33090). Firstly, in order to obtain the effective antimicrobial concentration, the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) were obtained *in vitro*. Subsequently, the melons were minimally processed and divided into three parts, the first part without inoculation, the second part inoculated with *E. coli* and the third part inoculated with *L. innocua*; immediately, the fresh-cut melon was immersed in two types of edible coating: a medium molecular weight chitosan edible coating (2%) and a chitosan edible coating added with trans-cinnamaldehyde (0.05%). Fresh-cut melon inoculated with water, inoculated with *E. coli* and inoculated with *L. innocua*, was used as controls. The determination of mesophilic bacteria, psychrophilic, coliform, yeasts and moulds was realized in non inoculated fresh-cut melon. In the other hand, the counting of *E. coli* and *L. innocua* was realized in inoculated fresh-cut melon; these microbiological analysis were done, in times: 0, 3, 7, 14 and 21 days of storage at 4 °C. Both edible coatings showed antimicrobial action against *E. coli* and *L. innocua*, mesophilic, psychrophilic, coliform bacterias, yeasts and moulds, no statistically significant difference was found between them ($P>0,001$). The chitosan edible coating added with trans-cinnamaldehyde (0.05%) do not show improved efficiency in its antimicrobial action, regarding the microorganisms used in this research.

Key words – Fresh-cut melon, Edible coating, Chitosan, Trans-cinnamaldehyde, Antimicrobial action, *Listeria*, *Escherichia*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Métodos para testar a eficácia antimicrobiana em alimentos	41
Figura 2 - Preparação das coberturas comestíveis.....	49
Figura 3 - Fluxograma do melão minimamente processado.....	51
Figura 4 - Fluxograma dos experimentos	53
Figura 5 - Inoculação do melão minimamente processado	54
Figura 6 - Seqüência de Imersão na cobertura comestível	55
Figura 7 - Seqüência de acondicionamento do melão minimamente processado	55
Figura 8 - Resultados da CIM do trans-cinamaldeído contra <i>E. coli</i> e <i>L. innocua</i>	64
Figura 9 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob o crescimento de bactérias mesófilas em melão minimamente processado.....	67
Figura 10 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob o crescimento de bactérias psicrófilas em melão minimamente processado	69
Figura 11 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob o crescimento de coliformes totais em melão minimamente processado.....	71
Figura 12 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob o crescimento de bolores e leveduras em melão minimamente processado	73
Figura 13 - Efeito da cobertura de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob o crescimento de <i>E. coli</i> em melão minimamente processado inoculado com <i>E. coli</i>	76
Figura 14 - Efeito da cobertura de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob o crescimento de <i>L. innocua</i> em melão minimamente processado inoculado com <i>L. innocua</i>	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frutas minimamente processadas mais consumidas nos Estados Unidos.....	17
Tabela 2 - Formulação da cobertura comestível de quitosana.....	49
Tabela 3 - Formulação da cobertura comestível de quitosana com trans-cinamaldeído	50
Tabela 4 - Resultados das análises físico-químicas do melão	60
Tabela 5 - Concentração inibitória mínima do trans-cinamaldeído contra <i>E. coli</i> e <i>L. innocua</i>	61
Tabela 6 - Concentração bactericida mínima do trans-cinamaldeído contra <i>E. coli</i> e <i>L. innocua</i>	62
Tabela 7 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob as bactérias aeróbias mesófilas no melão minimamente processado armazenados a 4 °C durante 21 dias.....	65
Tabela 8 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob as bactérias psicrófilas no melão minimamente processado armazenados a 4 °C durante 21 dias	68
Tabela 9 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob coliformes totais no melão minimamente processado armazenados a 4 °C durante 21 dias	70
Tabela 10 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob bolores e leveduras no melão minimamente processado armazenados a 4 °C durante 21 dias	72
Tabela 11 - Sobreviventes de <i>E. coli</i> em melão minimamente processado recobertos com cobertura de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído armazenados a 4 °C durante 21 dias	75
Tabela 12 - Sobreviventes de <i>L. innocua</i> em melão minimamente processado recobertos com cobertura de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído armazenados a 4 °C durante 21 dias	78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	<i>OBJETIVOS</i>	14
1.1.1	Objetivo geral.....	14
1.1.2	Objetivos específicos.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	MELÃO.....	15
2.2	<i>IMPORTÂNCIA DAS FRUTAS MINIMAMENTE PROCESSADAS</i>	16
2.3	<i>ELABORAÇÃO DE FRUTAS MINIMAMENTE PROCESSADAS</i>	17
2.4	<i>SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE FRUTAS MINIMAMENTE PROCESSADAS</i>	19
2.4.1	Origem da microbiota de frutas minimamente processadas.....	19
2.4.2	Microorganismos importantes em frutas minimamente processadas.....	20
2.4.2.1	<i>Escherichia coli</i>	21
2.4.2.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	22
2.4.2.3	<i>Salmonella</i> spp.	23
2.4.3	Surtos e incidências de bactérias patogênicas associadas a frutas “in natura” e minimamente processadas.....	25
2.5	<i>MÉTODOS DE CONTROLE</i>	26
2.5.1	Coberturas comestíveis.....	27
2.5.1.1	Quitosana.....	31
2.5.1.2	Trans-cinamaldeído.....	36
2.5.1.3	Coberturas de quitosana com óleos essenciais.....	38
2.6	<i>AValiação de substâncias antimicrobianas</i>	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1	<i>MATÉRIA PRIMA</i>	45
3.1.1	Melões	45
3.1.2	Insumos da cobertura.....	45
3.1.3	Embalagem e utensílios.....	45
3.1.4	Cepas	46
3.2	<i>PREPARO DOS INÓCULOS</i>	46

3.3	<i>DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)</i>	47
3.4	<i>PREPARAÇÃO DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS</i>	48
3.5	<i>PROCESSAMENTO DO MELÃO MINIMAMENTE PROCESSADO</i>	50
3.5.1	Recepção	52
3.5.2	Lavagem	52
3.5.3	Sanitização.....	52
3.5.4	Drenagem e secagem.....	52
3.5.5	Descascamento e corte	52
3.5.6	Delineamento dos experimentos	52
3.5.6.1	Inoculação	54
3.5.6.2	Imersão na cobertura e drenagem.....	54
3.5.7	Acondicionamento.....	55
3.5.8	Refrigeração	56
3.6	<i>ANÁLISES</i>	56
3.6.1	Análises microbiológicas	56
3.6.1.2	Experimento 1	57
3.6.1.3	Experimentos 2 e 3	58
3.7	<i>ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS</i>	58
3.7.1	Acidez titulável.....	59
3.7.2	pH.....	59
3.7.3	Sólidos solúveis totais (SST).....	59
3.8	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	59
4	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	60
4.1	<i>ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MELÃO</i>	60
4.2	<i>CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)</i>	60
4.3	<i>INCIDÊNCIA DE ESCHERICHIA COLI E LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	65
4.4	<i>EXPERIMENTO 1: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COBERTURAS DE QUITOSANA E DE QUITOSANA COM TRANS-CINAMALDEÍDO SOBRE A MICROBIOTA PRÓPRIA DO MELÃO MINIMAMENTE PROCESSADO</i>	65
4.4.1	Bactérias aeróbias mesófilas	65
4.4.2	Bactérias psicrófilas	68

4.4.3	Coliformes totais e <i>E. coli</i>	70
4.4.4	Bolores e leveduras	72
4.5	<i>EXPERIMENTO 2: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COBERTURAS DE QUITOSANA E DE QUITOSANA COM TRANS-CINAMALDEÍDO NO MELÃO MINIMAMENTE PROCESSADO INOCULADO COM E. coli ATCC 25922TM</i>	75
4.6	<i>EXPERIMENTO 3: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COBERTURAS DE QUITOSANA E DE QUITOSANA COM TRANS-CINAMALDEÍDO NO MELÃO MINIMAMENTE PROCESSADO INOCULADO COM L. innocua ATCC 33090</i>	77
5	CONSIDERAÇÕES GERAIS	79
6	CONCLUSÕES.....	81
	REFERENCIAS.....	82
	APÊNDICES.....	96

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o consumo de frutas tem aumentado consideravelmente, devido às suas propriedades nutricionais e baixo teor de calorias, tendo incentivado o crescimento da indústria de frutas minimamente processadas.

Este tipo de indústria caracteriza-se por produzir produtos prontos para o consumo e com características similares ao produto natural, alterando principalmente seu estado físico original. Porém, este processamento mínimo produz injúrias nos tecidos favorecendo a contaminação por microrganismos deterioradores e patogênicos.

A presença de microrganismos patogênicos neste tipo de produto é preocupante, pelo fato de serem consumidos crus. *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* têm sido implicados em surtos de origem alimentar devido ao consumo de frutas, necessitando as frutas minimamente processadas serem protegidas contra estas bactérias, visando sua inocuidade.

A utilização de coberturas comestíveis em frutas minimamente processadas está sendo amplamente pesquisada, pois aumentam a vida de prateleira e permitem introduzir antimicrobianos.

Os antimicrobianos de origem natural são os que estão sendo mais estudados, devido a sua aceitação pelos consumidores. O trans-cinamaldeído, como antimicrobiano natural, resulta uma boa alternativa, porque tem um sabor agradável e é um aditivo geralmente reconhecido como seguro (GRAS), porém sua utilização em alimentos é muitas vezes limitada, devido a alterações sensoriais.

Uma opção interessante para minimizar alterações sensoriais deste antimicrobiano, seria introduzi-lo em cobertura comestível que já tenha propriedades antimicrobianas, tais como a cobertura de quitosana.

É importante estudar a atividade antimicrobiana da cobertura comestível de quitosana adicionada com trans-cinamaldeído aplicada em melão "*Cantaloupe*", visando assegurar sua inocuidade, uma vez que este fruto possui características que favorecem a contaminação com microrganismos patogênicos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar *in vivo* a eficiência da cobertura de quitosana adicionada com o antimicrobiano trans-cinamaldeído em melão (*Cucumis melo* L) minimamente processado inoculado com *Escherichia coli* (ATCC 25922TM) e *Listeria innocua* (ATCC 33090).

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do trans-cinamaldeído contra *Escherichia coli* e *Listeria innocua*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana das coberturas de quitosana e de quitosana com trans-cinamaldeído sobre a microbiota própria do melão minimamente processado.
- Avaliar a atividade antimicrobiana das coberturas de quitosana e de quitosana com trans-cinamaldeído no melão minimamente processado inoculado com *Escherichia coli* e *Listeria innocua*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MELÃO

Em relação à origem do melão, não existe um critério homogêneo, alguns autores o consideram de origem asiática, outros de origem africana, outros ainda de origem indiana (devido a uma maior diversidade existente).

Dentro da ampla variedade de melões (*Cucumis melo* L), os mais produzidos são os melões inodoros (*Cucumis melo* var. *inodorus* Naud) e os melões aromáticos (*Cucumis melo* var. *cantaloupensis* Naud).

Os melões aromáticos “Apresentam aroma intenso, são mais doces que os inodoros, porém de baixa conservação pós-colheita, sendo considerados fisiologicamente como climatéricos” (BRAGA *et al.*, 2008, p. 279), tem tamanho médio, com superfície reticulada, verrugosa ou escamosa, e a sua polpa apresenta coloração alaranjada, salmão ou, em alguns casos, verde (MENEZES *et al.*, 2000 *apud* BASTOS, 2004, p. 5).

Uma das variedades mais cultivadas no mundo é o melão *Cantaloupe*, devido ao seu excelente sabor, e aroma (BASTOS, 2004, p. 6); características que se conservam quando são minimamente processados, é por esta razão que o melão minimamente processado é muito popular no mercado.

O melão para ser processado deve apresentar uma serie de características, como ter um alto conteúdo de açúcares¹ (colhido quando a metade do pedúnculo está separado do fruto, processo referido como 1/2 slip), a cavidade interior deve ser pequena, deve estar selecionado e calibrado para poder ser descascado e cortado mecanicamente, a textura deve ser crocante, a cor, sabor e aroma deve ser intenso e de vida pós-colheita de sete a dez dias (NAMESNY, 2003, p. 33).

Um problema que apresenta o melão é seu curto tempo de conservação, o que dificulta sua comercialização. Geralmente, estes melões em estado natural podem ser conservados por uma semana à temperatura ambiente e duas semanas sob refrigeração (ALMEIDA *et al.*, 2001, p. 2); este mesmo problema se observa no produto minimamente processado que tem uma vida de prateleira entre 5 a 7 dias devido a limitações microbiológicas, sensoriais e nutricionais (PASTOR-NAVARRO, 2010 p. 27).

¹ O conteúdo de açúcar no fruto não aumenta depois de realizada a colheita.

Como o melão minimamente processado é consumido cru, é um bom meio de cultivo para microrganismos, é pouco ácido (pH 5,2 a 6,7)², tem elevada atividade de água (a_w 0,97 a 0,99)³ é cultivado em contato direto com o solo e também pela reutilização das soluções sanitizantes, pode originar problemas sanitários (NAMESNY, 2003, p. 34).

No período 2007 - 2009 a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) se reuniram e estabeleceram que o melão, junto com as bagas e o tomate, ocupam o segundo nível de prioridade dentro dos produtos básicos do setor de frutas e hortaliças frescas que apresentam maior preocupação para a saúde pública sob a perspectiva da inocuidade microbiológica (COMISIÒN DEL CODEX ALIMENTARIUS, 2011, p. 2).

Por tanto, destaca-se a necessidade de melhorar a segurança microbiológica desta fruta tanto *in natura* como minimamente processada.

2.2 IMPORTÂNCIA DAS FRUTAS MINIMAMENTE PROCESSADAS

As frutas e hortaliças minimamente processadas foram introduzidas em países como Estados Unidos e França na década de 70 e 80, respectivamente e na América Latina na década de 90. (BASTOS, 2006, p. 12; GONZALES-AGUILAR *et al.*, 2004, p. 11; JENNYLYND; TIPVANNA, 2010, p. 2). Houve um maior crescimento comercial destes produtos nos países mais desenvolvidos, como Estados Unidos e países europeus, enquanto na América Latina ainda apresenta um crescimento pequeno. Segundo González- Aguilar *et al.* (2004, p. 12) esta tendência deve-se ao consumidor que está tomando consciência da importância de consumir frutas e hortaliças, ao acelerado ritmo de vida e a incorporação da mulher no setor de trabalho⁴.

Lopez-Vázquez (2010, p. 2) indica que existem também outros fatores que favorecem o consumo de produtos minimamente processados, tais como: quantidades mais ajustadas à atual realidade das famílias, aumento do nível salarial e outros.

Este tipo de produto atende ao mercado de restaurantes, cozinhas industriais, empresas de catering, hospitais e vendas a varejo, sendo comumente comercializado em supermercados.

² Dado informado pela Food and Drug Administration (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001).

³ *Id.*, 2001.

⁴ A introdução da mulher no mercado de trabalho provoca um aumento no consumo de alimentos fora do lar e a busca de alimentos prontos para o consumo que economizam tempo e esforço (GONZALES-AGUILAR *et al.*, 2004, p. 12).

Seu uso traz muitas vantagens, permitindo a padronização do produto, poupando trabalho, menor espaço de refrigeração, diminuição de desperdícios e aumento de disponibilidade.

As frutas minimamente processadas mais consumidas nos Estados Unidos⁵ são as descritas na Tabela 1, podendo encontrar-se no mercado em diferentes formatos, sendo os mais comuns: cubos, fatias, rodela, pedaços com ou sem pedúnculo, descascados ou em gomos (BASTOS, 2006, p. 12).

Tabela 1 - Frutas minimamente processadas mais consumidas nos Estados Unidos

Fruta	%
Melancia	47,5
Saladas de frutas	14,2
Melão “ <i>Cantaloupe</i> ”	8,6
Abacaxi	7,5
Melão “ <i>Honeydew</i> ”	2,7
Frutas tropicais	2,7
Cítricos	3
Morangos	2
Maças	1,8
Outros Melões	1,3
Outros	11,5

Fonte: Adaptada de Chryssogelos (2006, p. 11).

2.3 ELABORAÇÃO DE FRUTAS MINIMAMENTE PROCESSADAS

Os produtos minimamente processados são as frutas, hortaliças ou uma combinação destas, que receberam um ou vários tratamentos suaves que alteraram seu estado físico original, mas mantêm uma aparência e qualidade próximas ao produto fresco, caracterizando-se por estarem prontas para o consumo ou parcialmente preparadas.

Existem também outras características que os produtos minimamente processados devem apresentar, as quais são exigidas principalmente pelos consumidores: que sejam livres

⁵ O mercado de frutas minimamente processadas nos Estados Unidos, encontra-se plenamente consolidado (LOPEZ-VÁZQUEZ, 2010, p. 9).

de defeitos, que tenham um grau de maturação ótimo e que possuam uma elevada qualidade sensorial, nutricional, e sejam inócuas (LOPEZ-VÁZQUEZ, 2010, p. 4).

Para a elaboração de frutas minimamente processadas deve-se trabalhar sob higiene rigorosa e em ambiente climatizado à baixa temperatura⁶, aplicando-se processos segundo o tipo de fruta e segundo as características que se pretendem conseguir.

Geralmente o processo consiste em: lavagem, sanitização, descascamento e corte, embalagem e armazenamento. Cada uma destas etapas exerce um papel importante na qualidade e segurança microbiológica do produto final.

A lavagem das frutas tem por objetivo retirar as sujeiras da superfície e reduzir a carga microbiana inicial. É possível diminuir até 1 ciclo log., no entanto, isto dependerá de outros fatores, tais como: a carga microbiana inicial, o tipo de microrganismo e o método de lavagem. A utilização de água para a lavagem melhora a qualidade do produto, mas também pode ser uma fonte de contaminação com microrganismos patogênicos e deteriorantes (BASTOS, 2006, p. 34).

A sanitização da superfície tem a finalidade de auxiliar na eliminação de microrganismos aderidos através do uso de produtos químicos como: hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e ozônio. A concentração e o tempo de permanência dos compostos clorados dependeram das características das frutas e da microbiota dos produtos (BASTOS, 2004, p. 9).

O descascamento e o corte são cruciais porque se não foram feitas com cuidado, podem ser uma porta de entrada para muitos microrganismos deteriorantes e patogênicos (BASTOS, 2004, p. 14; CORBO, 2010, p. 1144; LAMINKARA, 2002, p. 57).

A embalagem tem por objetivo proteger o produto final contra danos do meio ambiente e de futuras contaminações por microrganismos, e representa também um elemento primordial para a aceitação do produto pelo consumidor, devendo ser armazenada e refrigerada entre 4 a 7°C (BASTOS, 2004, p. 15, 16; BASTOS, 2006, p. 41).

Na área de processamento, é importante manter uma separação física entre a denominada “área suja”, que compreende o setor de recepção da matéria prima, de eliminação de desperdícios, e o setor de pré-lavagem do produto inteiro, da “área limpa”, onde se operam em condições mais estritas de assepsia e higiene e compreende as seguintes etapas: lavagem, sanitização, corte e embalagem, para evitar a contaminação cruzada (MOLTÓ, 2010, p. 12).

⁶ Para retardar os processos de senescência que as operações de processamento desencadeiam nos tecidos vegetais e no crescimento de microrganismos (MOLTÓ, 2010, p. 12).

2.4 SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE FRUTAS MINIMAMENTE PROCESSADAS

A segurança microbiológica dos alimentos em geral é um aspecto de vital importância na indústria de alimentos, que pode considerar-se como o principal fator da qualidade do produto, pelos efeitos que tem sobre a vida de prateleira do produto e especialmente pelos efeitos adversos que pode causar à saúde humana (JENNYLYND; TIPVANNA, 2010, p. 16).

Um dos principais riscos é a presença de microrganismos patogênicos, que podem causar doenças humanas, diretamente quando são consumidos em conjunto com o produto (infecção) ou quando produzem toxinas ou substâncias químicas no produto antes de ser consumidos (intoxicação) (JENNYLYND; TIPVANNA, 2010, p. 17).

As frutas minimamente processadas são consideradas alimentos de alto risco, por serem consumidas cruas, sendo necessário fazer um estudo mais profundo que englobe a origem da microbiota, identificando quais são os microrganismos, como também avaliando as incidências e surtos associados a frutas *in natura* e minimamente processadas.

2.4.1 Origem da microbiota de frutas minimamente processadas

No seu estado natural, as frutas podem ser contaminadas no campo, com microrganismos patogênicos que são amplamente relacionados com a agricultura, tais como: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Clostridium* e *Escherichia coli* (IFPA, 2001 *apud* BASTOS, 2004, p. 21).

As fontes de contaminação no campo podem ser o solo, a água de irrigação, a adubação verde, compostagem inadequada, o ar, os animais selvagens ou domésticos e a manipulação humana (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001).

Durante a colheita e pós-colheita as frutas podem ser contaminadas através de contato com animais domésticos, com esteiras transportadoras, com superfícies da área de trabalho, com a água de lavagem, com caixas e/ou monoblocos para embalagens, com pallets e caminhões utilizados para o transporte e também pelo contato com o pessoal de campo (BASTOS, 2006, p. 30).

As frutas minimamente processadas podem sofrer contaminação durante o processamento, por vários meios: matéria prima, falhas durante as etapas de produção, higiene

e sanitização inadequadas, equipamentos e utensílios, pessoal e ambiente da unidade processadora (BASTOS, 2006, p. 30).

Os produtos minimamente processados são danificados especialmente na etapa do corte. Durante esta etapa, tanto os microrganismos deterioradores como patogênicos, se presentes, podem contaminar a superfície do fruto ou hortaliça ou penetrar no tecido. Corbo *et al.* (2010, p. 1144) ressaltam a importância do corte na deterioração e proliferação microbiana, uma vez que esta operação aumenta a área de tecidos danificados.

Os danos nos tecidos provocam a liberação de enzimas que interagem com substratos do fruto, aumentando a produção de etileno e estimulando a respiração. Essas reações provocam a degradação da parede celular, a perda de água, redução nos níveis de hidratos de carbono, vitaminas e ácidos orgânicos. Tudo isto favorece ao crescimento microbiano na superfície de corte à medida que se tornam disponíveis estes fluidos (JENNYLYND; TIPVANNA, 2010, p. 26).

Como na maior parte dos produtos frescos ou minimamente processados a contaminação microbiana é superficial, é necessário um efetivo sistema de controle para evitar o crescimento de microrganismos.

É importante ressaltar que os controles aplicados tenham como alvo os microrganismos patogênicos, porque sua presença no produto não é detectável, uma vez que eles não causam a deterioração do alimento a não ser em populações muito altas. Geralmente as legislações requerem contagens microbianas muito baixas, que poderiam em alguns casos comprometer a segurança do produto, já que na ausência de microrganismos deteriorantes, os microrganismos patogênicos poderiam se desenvolver mais facilmente por não ter competição pelos nutrientes (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001).

2.4.2 Microorganismos importantes em frutas minimamente processadas

Os microrganismos associados a frutas minimamente processadas podem variar de acordo com o tipo de produto e as condições de armazenamento. A temperatura desempenha um papel significativo na determinação da natureza da microbiota destes produtos (JENNYLYND; TIPVANNA, 2010, p. 28).

Os microrganismos deterioradores mais encontrados em frutas minimamente processadas são: bactérias ácido lácticas, bolores e leveduras. Entre os patogênicos estão as bactérias, vírus e parasitas, tais como protozoários. As bactérias são as de maior preocupação em termos de casos relatados e gravidade de doenças, destacando-se as bactérias

psicrotropicas⁷ como *Listeria*, podendo-se encontrar também *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* e *Escherichia coli* (JENNYLYND; TIPVANNA, 2010, p. 28).

2.4.2.1 *Escherichia coli*

Este microrganismo é um bacilo Gram negativo, não esporulado, móvel, aeróbio e anaeróbio facultativo. Apresenta crescimento ótimo no intervalo de 35 a 40 °C e pH de 4,4 a 9⁸ (BELL; KYRIAKIDES, 1998, p. 54, 57). Silva *et al.* (2010 p. 134) reportam que existem cepas de *E. coli* capazes de crescer em alimentos refrigerados.

Seu habitat natural é o trato intestinal de animais de sangue quente, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais. Estes organismos são comuns nos ambientes de manufatura de alimentos, podendo se tornar parte da microbiota residente, principalmente se as condições de limpeza são inadequadas (SILVA *et al.*, 2010, p. 134).

É importante ressaltar que “diversas linhagens de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e para os animais” (FRANCO; LANDGRAF, 2008, p. 50). Estes microrganismos são capazes de produzir um amplo espectro de doenças, como infecção urinária, septicemia, meningites ou diarreias (RIVERO *et al.*, 2004, p. 353).

As linhagens de *E. coli* consideradas patogênicas são agrupadas⁹ em cinco classes: *E. coli* entero patogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EA_ggEC) (FRANCO; LANDGRAF, 2008, p. 50).

E. coli entero-hemorrágica (EHEC), dentre os isolados de *E. coli* que causam doenças transmitidas por alimentos, é o grupo mais significativo com base na gravidade da doença (DOYLE; BEUCHAT; MONTVILLE, 2001, p. 193); O sorotipo O157:H7 produz grandes quantidades de um ou mais toxinas potentes que causam danos severos no intestino, como a colite hemorrágica, caracterizada por cólicas severas (dor abdominal) e diarreia, que é inicialmente aquosa, mas torna-se sanguinolenta. Ocasionalmente, o vômito ocorre e a febre pode ser leve ou estar ausente. A doença dura em média 8 dias e todas as pessoas são consideradas suscetíveis a colite hemorrágica, mas as crianças pequenas e idosos parecem

⁷ Organismos que podem crescer em condições de refrigeração.

⁸ *E. coli* O157:H7 e ácido resistente, sobrevivendo a valores de pH menores que 4,4 (BELL; KYRIAKIDES, 1998, p. 57).

⁹ Agrupação feita com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia (FRANCO; LANDGRAF, 2008, p. 50).

progredir para sintomas mais sérios com maior frequência (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION 200-?c).

A dose infecciosa é desconhecida, mas a partir de uma compilação de dados de surtos, estima-se que a dose pode ser semelhante à de *shigella spp.*, ou seja, 10 UFC/g (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 200-?c).

A grande maioria de surtos atribuídos a bactéria *E. coli O157:H7* têm sido associado à carne mal cozida de hambúrguer e produtos lácteos. No entanto, os surtos também foram associados à alface, cidra de maçã não pasteurizada, melão e brotos. *E. coli O157:H7* cresce rapidamente em vários tipos de frutas e vegetais crus, especialmente quando são armazenados em temperaturas acima de 12 °C (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001).

2.4.2.2 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é um “bacilo Gram positivo, não formador de esporo, anaeróbio facultativo” (FRANCO; LANDGRAF, 2008, p. 46), capaz de crescer de 0 a 45 °C, pH de 5,6-9,6 e atividade de água superior ou igual a 0,97 (DOYLE; BEUCHAT; MONTVILLE, 2001, p. 385).

Segundo Silva *et al.* (2010, p. 261) “O reservatório primário parece ser o solo e a vegetação, mas é amplamente distribuída no ambiente, encontrada no solo, água, fezes, esgotos, plantas em decomposição e silagem”.

Sabe-se que a maioria das *L. monocytogenes* são patogênicas em algum grau, e que causam uma doença aguda conhecida como listeriose. Este nome é dado ao grupo geral de distúrbios causados por este microrganismo, que podem ter um período de latência de alguns dias até três semanas¹⁰. A dose infectante é desconhecida, mas acredita-se que varia com a cepa e a susceptibilidade da vítima; sendo as mulheres grávidas, pessoas imunocomprometidas, e pacientes com câncer as mais vulneráveis (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION 200-?d).

Sua capacidade de crescer em ausência de oxigênio, em temperaturas de refrigeração e por sobreviver em plantas de processamento a tornam um microrganismo de interesse especial. (D’AMICO; DONELLY, 2008 *apud* HEALTH CANADÁ, 2010), sendo seu controle difícil, principalmente nos alimentos que não sofrem tratamento térmico.

¹⁰ Doenças causadas pela *L. monocytogenes* incluem: septicemia, meningite, encefalite, infecção cervical ou intra-uterina em gestantes, as quais podem provocar aborto (no segundo ou terceiro trimestre) (SÃO PAULO, 2003).

Existem relatos da incidência de *L. monocytogenes* em leite cru, queijo mole, carnes frescas, ou congeladas, frango, frutos do mar, frutas e produtos vegetais (JAY, 2005, p. 524).

Alguns países estabeleceram limites para a presença de *L. monocytogenes* em alimentos, especialmente em produtos prontos para o consumo. Os Estados Unidos exige tolerância zero em todos os alimentos e sob todas as circunstâncias, no entanto, Alemanha, Dinamarca e Canadá não o exigem (JAY, 2005, p. 536; JENSON *et al.*, 2009, p. 243).

A Comissão Européia exige que os produtos prontos para consumo que sejam capazes de suportar o crescimento de *L. monocytogenes*¹¹ não possuam mais do que 100 UFC/g durante o seu período de vida útil. No caso de alimentos destinados a lactantes ou para fins medicinais específicos é exigida tolerância zero (EUROPA, 2005, p. 13).

No Brasil, não há um limite estipulado para *L. monocytogenes* para alimentos em geral, mas de acordo com a Resolução RDC nº 12, deve existir ausência deste patógeno em 25 g de amostra de queijo (BRASIL, 2001).

“A comissão Internacional em Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF), parece ter concluído que, se esse microrganismo não excede 100 UFC/g de alimentos, este pode ser considerado aceitável para indivíduos que não estão sob risco” (JAY, 2005, p. 537).

2.4.2.3 *Salmonella* spp.

“*Salmonella* é um gênero da família Enterobacteriaceae, definido como bastonetes Gram negativos não esporogênicos, anaeróbios facultativos (SILVA *et al.*, 2010, p. 288). O pH ótimo para sua multiplicação fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4 são bactericidas (FRANCO; LANDGRAF, 2008, p. 56). As temperaturas mais baixas observadas para o crescimento foram de 5,3 °C para *S. heidelberg* e 6,2 °C para *S. typhimurium*; temperaturas em torno de 45 °C foram descritas como temperaturas limite de crescimento. Em relação à umidade disponível, a inibição do crescimento foi observada em valores de atividade de água (a_w) abaixo de 0,94 em meios com pH neutro e com a_w maiores, os valores de pH podem ser menores (JAY, 2005, p. 550).

¹¹ Leite, produtos lácteos com alto teor de gordura (manteiga e creme de leite), queijos curados com umidade >50% (cottage e ricota), crustáceos (camarão e caranguejo), frutos do mar defumados (peixes e moluscos defumados), frutos de mar crus que serão consumidos como sushi ou sashimi, muitos vegetais (couve, brócolis e saladas verdes), frutas não ácidas (melão, melancia, mamão), algumas saladas e sanduíches (particularmente os que contêm frutos de mar e as que são preparadas em estabelecimentos de venda à varejo, sem acidificação e/ou a adição de substâncias antimicrobianas) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2008).

Segundo a classificação taxonômica e nomenclatura, proposta por Ellermeier e Slauch (2005 *apud* SILVA *et al.*, 2010, p. 288) a qual foi adotada pelo CDC (US Center for Disease Control and Prevention), ASM (American Society for Microbiology) e OMS (Organização Mundial de Saúde) o gênero *Salmonella* está composto de duas espécies, *Salmonella entérica* e *Salmonella bongori*. “A *Salmonella entérica* está subdividida em seis subespécies: entérica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae e indica.”. A *Salmonella entérica* subsp. *enterica* e definida também segundo a nomenclatura dos sorotipos em: *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. Typhi*, *S. paratyphi*.

Franco e Landgraf (2008, p. 57) indicam que as doenças causadas por *Salmonella* costumam ser subdivididas em três grupos: a febre tifóide, causada por *Salmonella typhi*, as febres entéricas, causadas por *Salmonella paratyphi* (A, B, C) e as enterocolíticas (ou salmoneloses), causadas pelas demais salmonelas.

A febre tifóide dura de uma a oito semanas e só acomete o homem, sendo normalmente transmitida por água e alimentos contaminados com material fecal humano. Os sintomas são muito graves, e incluem septicemia (multiplicação da *Salmonella* no sangue), febre alta, diarreia e vômitos. As febres entéricas podem durar no máximo três semanas e apresentam sintomas bastante semelhantes à febre tifóide, mas os sintomas clínicos são mais brandos. As salmoneloses caracterizam-se por sintomas que incluem diarreia, febre, dores abdominais e vômitos. Os sintomas aparecem, em média, entre 12 e 36 horas após o contato com o microrganismo, durando entre um e quatro dias. Nas crianças pequenas e recém-nascidos, a salmonelose pode ser bastante grave, já que a *Salmonella* pode atingir a corrente circulatória e provocar lesões em outros órgãos. No adulto, algumas patologias, quando presentes, podem agravar a doença.¹² A dose necessária de *Salmonella* para causar esta doença dependerá do sorotipo de *Salmonella* envolvido, da competência dos sistemas de defesa inespecíficos e específicos do indivíduo afetado e das características do alimento envolvido¹³, podendo ser necessário então uma ingestão de um número elevado ($>10^8$) ou de 50 células/g (FRANCO; LANDGRAF, 2008, p. 57).

Esta bactéria encontra-se naturalmente em animais e no ambiente, sendo as principais fontes: a água, o solo, as fezes de animais, os insetos e as superfícies de

¹² A salmonelose num indivíduo com esquistossomose caracteriza-se por bacteremia (circulação do microrganismo pelo sangue), febre de evolução prolongada, anemia e esplenomegalia. Indivíduos aidéticos ou com outras deficiências imunológicas podem ter salmoneloses muito graves (FRANCO; LANDGRAF, 2008, p. 57).

¹³ Em alimentos com elevado teor lipídico, as salmonelas ficam “protegidas” dentro de glóbulos de gordura, não sendo afetadas pelas enzimas digestivas ou pela acidez gástrica (*Id.*, 2008, p. 57).

equipamentos e utensílios de fabricas e cozinhas. A doença geralmente é contraída através do consumo de alimentos contaminados de origem animal, principalmente a carne bovina, a carne de aves, os ovos e o leite. Os vegetais contaminados com esterco também tem sido implicados na transmissão. A bactéria atinge toda a cadeia de produção de alimentos, a partir dos produtos primários. Já tendo sido implicados com salmoneloses: peixes, produtos de confeitaria recheados com cremes, gelatina desidratada, cacau, chocolate, coco e os molhos e coberturas para saladas não industrializadas e preparadas com ovos crus (SILVA *et al.*, 2010, p. 292, 293).

2.4.3 Surtos e incidências de bactérias patogênicas associadas a frutas “in natura” e minimamente processadas

Os relatos de surtos de origem alimentar relacionados com produtos frescos contaminados são maiores nos últimos anos. Isto pode dever-se principalmente a um maior consumo de produtos frescos, às mudanças na produção e ao maior interesse destes produtos por parte dos funcionários da saúde.

Uma grande variedade de bactérias, vírus e parasitas tem sido relacionados a surtos¹⁴ de doenças associadas às frutas frescas (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001). Conforme Raybaudi-Massilia *et al.* (2009a, p. 159) de 1954 até 2005, a maioria dos surtos foram associados a diferentes sorotipos de *Salmonella* e *E. coli* O157:H7, e os veículos para estes microrganismos foram melancias, melões, mangas, morangos, pêras e saladas de frutas.

A comissão do Codex alimentarius ressalta que os melões “*Cantaloupe*”, melões de pele lisa e melancias são implicados a doenças transmitidas por alimentos contaminados comumente com *Salmonella entérica*, *Escherichia coli* enterohemorrágica e norovírus. (COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS, 2011).

Ultimamente, *Listeria monocytogenes* foi responsável por um dos maiores surtos nas ultimas décadas, nos Estados Unidos em setembro de 2011. O Centro para controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos, relatou que 146 pessoas ficaram doentes, 142 hospitalizadas, 30 morreram e ocorreu um aborto espontâneo em uma mulher grávida, decorrente do consumo de melão “*Cantaloupe*” contaminado com este microrganismo (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011).

¹⁴ Surto é quando duas ou mais pessoas tem a mesma doença causada pelo mesmo alimento ou bebida contaminada (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011).

Resultados de diferentes pesquisas demonstraram que microrganismos patogênicos podem sobreviver e crescer em frutas minimamente processadas, por exemplo, a laranja minimamente processada mostrou ser um adequado substrato para crescimento de *L. monocytogenes* (CAGGIA *et al.*, 2009, p. 64), pêssegos minimamente processados armazenados a 10 °C mostraram ser um bom substrato para o crescimento de *E. Coli* O157:H7, *Salmonella* e *L. innocua* (ALEGRE *et al.*, 2010, p. 867), e no fruto do cactus minimamente processada e armazenada em atmosfera modificada a 4 °C foi registrado o crescimento de *Listeria monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 (CORBO *et al.*, 2005, p. 166, 169).

2.5 MÉTODOS DE CONTROLE

Como a contaminação com patógenos pode ocorrer em qualquer fase da sua produção, colheita, manuseio, processamento, armazenamento ou distribuição para os consumidores, devem ser aplicadas estratégias que permitam minimizar os riscos microbiológicos: Aplicar boas práticas de agricultura entre o campo e a planta de processamento mínimo; aplicar boas práticas de fabricação para minimizar a contaminação do produto na planta de processamento; implementar o controle e análises de perigos e pontos críticos de controle (HACCP) que nos proporcionará uma estrutura para a identificação, avaliação e controle de riscos (LAMINKARA, 2002, p. 58, 60; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001).

Belfiore *et al.* (2011, p. 141) ressaltam que no processamento de frutas minimamente processadas não há nenhum passo definitivo que elimine a presença de microrganismos patogênicos, sendo necessário aplicar uma combinação de obstáculos.

Alguns controles aplicados durante o processamento mínimo de frutas podem ser: a sanitização, as baixas temperaturas, as atmosferas modificadas, coberturas comestíveis, e tratamentos físicos não térmicos.

A sanitização com soluções de cloro ou outras substâncias¹⁵, para descontaminar a superfície das frutas inteiras, como também as frutas cortadas em concentrações menores. Porém a eliminação da microbiota própria do produto pode favorecer o desenvolvimento de bactérias indesejáveis tais como *L. monocytogenes*, que cresce mais rápido em amostras altamente desinfetadas (LAMINKARA, 2002, p. 44).

¹⁵ Dióxido de cloro, fosfato trissódico, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e ozônio (RAYBAUDI-MASSILIA *et al.*, 2009a, p. 158).

Baixas temperaturas têm sido utilizadas para preservar a qualidade e prolongar a vida de prateleira de produtos minimamente processados. Embora o armazenamento à frio retarde muitos processos bioquímicos em alimentos, as reações enzimáticas, e o crescimento de microrganismos psicrotróficos, continuam (LAMINKARA *et al.*, 2000, p. 5955).

As atmosferas modificadas diminuem o crescimento microbiano, mantêm as propriedades nutricionais e retardam o escurecimento, mas não substituem a cadeia de frio, nem inibem totalmente o crescimento microbiano (NAMESNY, 2003, p. 36), podendo crescer *L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* se estiverem presentes (TAPIA; RAYBAUDI-MASSILIA; MARTIN-BELLOSO, 2005, p. 117).

As coberturas comestíveis, além de proporcionar brilho ao produto tornando-o mais atrativo ao consumidor, proporcionam uma capa protetora adicional que tecnologicamente é equivalente a uma atmosfera modificada, que permite retardar a deterioração e a maturação, a perda de água, as mudanças de cor, a perda de aromas e pode servir como transporte de substâncias como antioxidantes, estabilizantes e antimicrobianos.

Existem também outros tratamentos físicos não térmicos que surgiram para melhorar a segurança microbiológica e a qualidade de produtos minimamente processados incluindo as frutas, tais como: a irradiação ionizante, alta pressão hidrostática, luz ultravioleta, luz pulsada e ultra-som. Porém, para poder eliminar os microrganismos patogênicos, alguns destes tratamentos requerem altas intensidades que poderiam causar mudanças adversas nas propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos (ROSS *et al.*, 2003, p. 125).

2.5.1 Coberturas comestíveis

As coberturas comestíveis podem ser definidas como uma camada fina de material que cobre a superfície do alimento e pode ser consumido como parte do produto (VARGAS *et al.*, 2008, p. 496).

Para elaborar este tipo de coberturas devem-se utilizar aditivos permitidos para uso alimentício (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 200-?a). E são três os ingredientes principais que devem estar presentes: um polímero, um solvente e um plastificante (AVILA-SOSA; LÓPEZ-MALO, 2008, p. 6).

Dentre os polímeros que podem ser utilizados estão os polissacarídeos, as proteínas e os lipídeos.

- a) polissacarídeos: como amido e seus derivados, alginatos, derivados da celulose, carragena, quitosana, pectina e outros. Caracterizam-se por apresentar boas

propriedades como barreira contra gases, por permitir passagem de umidade, e também, por aderirem-se bem as superfícies de frutas e hortaliças cortadas (BALDWIN, 1999, p. 486);

- b) proteínas: como colágeno, gel, proteína do leite, trigo, glúten, proteína de soja, zeína e outros. Apresentam uma estrutura que outorga melhor barreira contra oxigênio, mas tem baixa resistência a água (BALDWIN, 1999, p. 484);
- c) lipídeos: como cera, cera de abelha, cera de carnaúba, goma-laca, triglicerídeos, monoglicerídeos acetilados, ácidos graxos, e outros. Podem restringir o intercâmbio do CO₂ e são uma boa barreira contra a umidade. No entanto, formam coberturas com superfície gordurosa e propriedades sensoriais indesejáveis, tais como gosto de cera e sabor rançoso (GUILBERT, 1986 *apud* LIN; ZHAO, 2007, p. 65).

O solvente a utilizar-se, tem que ser inócuo e geralmente limita-se o uso a água, variando-se somente seus valores de pH para poder conseguir solubilizar o polímero (GUILBERT; GONTARD; GORRIS, 1996 *apud* AVILA-SOSA; LÓPEZ-MALO, 2008, p. 6).

O plastificante tem como objetivo proporcionar flexibilidade e certa resistência a cobertura comestível. Este tem que ser miscível no polímero, e de grau alimentício, utilizando-se geralmente: sorbitol, glicerol, manitol, sacarose e polietilenglicol (BALDWIN, 1999, p. 489; SRINIVASA; THARANATHAN, 2007, p. 65).

Foram descritos os ingredientes necessários para elaborar uma cobertura simples, mas também podem ser feitas coberturas compostas que permitiram melhorar as propriedades mecânicas e de barreira das coberturas que foram elaboradas a partir de um único material.

As coberturas compostas permitem aproveitar as vantagens de cada ingrediente. Por exemplo, ao elaborar uma cobertura comestível a partir de polissacarídeos ou proteínas, obter-se-ia a matriz estrutural da cobertura com barreira contra gases, e ao adicionar lipídeos a esta matriz obter-se-ia resistência ao vapor de água (GUILBERT, 1986 *apud* NAVARRO-TARAZAGA, 2007, p. 15).

Quando o lipídeo é adicionado à matriz da cobertura comestível, pode-se formar uma *cobertura emulsionada*, onde o lipídeo está emulsionado na matriz ou pode-se formar uma *cobertura bicapa*, onde o lipídeo está separado da matriz formando uma camada dupla (NAVARRO-TARAZAGA, 2007, p. 15).

As propriedades das coberturas emulsionadas podem ser melhoradas adicionando agentes emulsificantes nas formulações. Estes emulsionantes favorecem a formação da

emulsão e sua estabilização, isto é, favorecem a dispersão do lipídeo na matriz da cobertura comestível, e melhoram a capacidade da cobertura para aderir-se ao alimento (NAVARRO-TARAZAGA, 2007, p. 15). Alguns dos emulsificantes utilizados na formulação de coberturas comestíveis são: ácidos graxos, monoacilglicerois, lecitina e seus derivados, etilenoglicol, monoestearato, glicerol monoestearato, ésteres de ácidos graxos e sorbitol ou Tweens e ésteres de sacarose (BALDWIN, 1999, p. 489).

As coberturas comestíveis além de conter ingredientes que formam a matriz estrutural e os ingredientes para formar uma cobertura composta, têm também outros compostos com diversas funções que ajudam a melhorar a qualidade do produto coberto; estes compostos podem ser: antioxidantes, antimicrobianos, reafirmantes de textura, sabores artificiais, cor e nutracêuticos (BALDWIN, 1999, p. 489).

Na formação de coberturas comestíveis, deve-se considerar que ocorrem duas forças a nível molecular. A primeira é a força de coesão que atua entre as moléculas do polímero, e a segunda é a força de adesão que se exerce entre a cobertura e o suporte onde está se formando (AVILA-SOSA; LÓPEZ-MALO, 2008, p.7). O grau de coesão dependerá da estrutura polimérica, do solvente utilizado, da temperatura e da presença do plastificante (AVILA-SOSA; LÓPEZ-MALO, 2008, p.7; SRINIVASA; THARANATHAN, 2007, 65).

Respeito às propriedades funcionais das coberturas, sabe-se que elas mantêm a qualidade dos produtos recobertos, retardando as principais causas de alterações através de diferentes mecanismos:

- a) reduzir a migração de água, solutos e gases que provocam modificações na textura e influenciam na estabilidade dos alimentos sensíveis a oxidação de lipídeos, vitaminas e pigmentos (GUO, 1996, *apud* XIANGYOU; CONGCONG; ZHANLI, 2011, p. 769);
- b) reduzir a taxa de respiração, a perda de peso, a ocorrência de escurecimento enzimático durante a armazenagem, o que em geral aumenta a vida de prateleira da fruta (VARGAS *et al.*, 2008, p. 503).
- c) reforçar ou manter a integridade estrutural do produto coberto (NAVARRO-TARAZAGA, 2007, p. 12; SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999, p. 41);
- d) reter compostos voláteis (LIN; ZHAO, 2007, p. 66).
- e) introduzir ingredientes funcionais tais como antimicrobianos, agentes antioxidantes, nutracêuticos e ingredientes como sabor e cor (DIAB *et al.*, 2001, p. 989; PRANOTO; RAKSHIT; SLOKHE, 2005, p. 865).

As propriedades funcionais descritas dependerão de vários fatores tais como: a matriz estrutural utilizada (conformação, peso molecular, distribuição de cargas); as condições nas quais foi elaborada a cobertura (tipo de solvente, pH, concentração de componentes, temperatura, outras) e também do tipo e concentração dos aditivos (plastificantes, agentes entrecruzantes, antimicrobianos, antioxidantes, emulsificantes, outros) (BALDWIN, 1999, p. 479; QUINTERO *et al.*, 2010, p. 95).

Há diversas pesquisas que demonstram que as coberturas comestíveis podem manter os aditivos adicionados na superfície do alimento durante mais tempo, permitindo que estes atuem mais efetivamente do que quando são aplicados em soluções aquosas (mediante dispersão ou imersão) (BALDWIN, 1999, p. 481). Estas observações incentivam que se pesquise mais amplamente a incorporação de antimicrobianos às coberturas comestíveis para prover estabilidade microbiológica aos alimentos e por tanto, estender a vida de prateleira do produto e reduzir o risco de crescimento de patógenos em sua superfície.

Os antimicrobianos adicionados podem ser sintéticos como os: benzoatos, propionatos, parabenos, sorbatos, agentes de cura ou podem ser de origem natural como os procedentes de animais (lactoperoxidase, lisozima, e quitosana), de vegetais (óleos essenciais, aldeídos, ésteres, ervas e especiarias), e microbianas (nisina) (RAYBAUDI-MASSILIA *et al.*, 2009a, p. 157).

Segundo Rodgers (2001, p. 276) a utilização de agentes sintéticos na conservação de alimentos não é compatível com a imagem de produtos “frescos” ou naturais. Por tanto, a alternativa mais atrativa é a utilização dos agentes antimicrobianos naturais para produtos minimamente processados.

Muitos destes compostos naturais apresentam potencial antimicrobiano em estudos realizados *in vitro*. Porém, para sua aplicação como agentes conservadores em alimentos, dois aspectos de extrema importância devem ser considerados: mudanças nas características sensoriais do produto e interações entre estes compostos e os ingredientes presentes nas coberturas. Frequentemente essas interações afetam o potencial antimicrobiano destes compostos resultando em efeitos moderados ou até insignificantes na conservação dos alimentos (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004, p. 711).

Um dos compostos antimicrobianos mais estudados é a quitosana, que além de formar parte da estrutura da cobertura comestível, também, em certas concentrações, tem a capacidade de inibir o crescimento microbiano (AVILA-SOSA; LÓPEZ-MALO, 2008, p.10).

Outros compostos que estão sendo amplamente estudados são os óleos essenciais. Estes óleos apresentam propriedades antimicrobianas, antivirais, antifúngicas, antioxidantes,

antiparasíticas e inseticidas (BURT, 2004, p. 225). Há relatos de que os óleos essenciais e/ou seus compostos ativos melhoram em certo grau as propriedades de barreira do filme. Rojas-Grau *et al.* (2006, p. 9265) observaram que a adição dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e canela (*Cinnamomum cássia*), na solução formadora do filme de purê de maçã (polissacarídeo), além de terem atividade antimicrobiana, melhoravam as propriedades de barreira do filme, diminuindo a permeabilidade ao vapor de água, aumentando a permeabilidade do oxigênio, mas não alterando as propriedades de tensão do filme. Em outra pesquisa, observou-se que somente a incorporação de cinamaldeído¹⁶ em relação a outros óleos e compostos ativos testados, teve uma leve diminuição da permeabilidade ao vapor de água (ROJAS-GRAU *et al.*, 2007a, p. 637).

2.5.1.1 Quitosana

A quitosana é um polímero natural obtido por desacetilação da quitina, e é o polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose (AVILA *et al.*, 2010, p. 74); suas fontes principais são o exoesqueleto de muitos crustáceos, asas de insetos, paredes celulares de fungos, algas etc., (HERNANDEZ-ALVARADO, 2009, p. 26).

Este polímero é constituído principalmente por unidades policatiônicas que conferem características únicas de funcionalidade, as quais dependerão principalmente da fonte de obtenção e do método de preparo. Segundo No *et al.* (2007, p. 97) as propriedades funcionais da quitosana comercial estão relacionadas com seu grau de acetilação e seu peso molecular.

Entre as propriedades mais importantes da quitosana, cita-se: é solúvel em ácidos minerais e orgânicos diluídos; não é solúvel em pH superior a 6.0 e funciona somente em sistemas ácidos, sendo uma propriedade relevante para sua aplicação em alimentos (PIQUERO, 2010, p. 15); é bioabsorvível e biodegradável; não tóxico¹⁷ (RAAFAT *et al.*, 2008, p. 3764); tem propriedades antimicrobianas (NO *et al.*, 2002, p. 71) e também tem propriedades dietéticas e metabólicas (SUGANO *et al.*, 1992 *apud* NO *et al.*, 2007, p. 87).

No que se refere a seu estado legal, a Administração de Drogas e Alimentos (Food and Drug Administration - FDA) dos Estados Unidos, no ano de 2005 admitiu a quitosana

¹⁶ Principal composto maioritário dos óleos de canela (FRIEDMAN; KOZUKUE; HARDEN, 2000, p. 5702).

¹⁷ A dose letal em ratos é superior a 16 g/dia/kg de peso corporal, o qual resulta ser mais alto que para a sacarose (RAAFAT *et al.*, 2008, p. 3764).

derivada do camarão como uma substância GRAS para uso em procedimentos científicos em alimentos em geral, em conformidade com as boas praticas de produção¹⁸ (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2005). Porém, até agora não foi oficialmente proclamado como substância GRAS (RAAFAT; SAHL, 2009 *apud* JIANG, L., 2011, p. 11), mas países como Japão e Coréia, utilizam a quitosana como aditivo alimentar ou suplemento (NO *et al.*, 2007, p. 87).

A quitosana pode ser aplicada em diversas áreas, tais como: agricultura, indústria alimentícia, indústria cosmética, medicina, em tratamentos de águas, etc. Na indústria alimentícia a quitosana foi aplicada para a desacidificação e clarificação de sucos (SHAHIDI, ARACHCHI; JEON, 1999, p. 37), em filmes e coberturas comestíveis (JIANG; NEETOO; CHEN, 2011, p. 25; NO *et al.*, 2007, p. 98), em alimentos dietéticos, como emulsionante, como conservante, na microemulsificação de substâncias alimentícias e para a imobilização de células e enzimas (DUTTA, P.; DUTTA, J.; TRIPATHI, 2004, p. 25).

Dentre as diversas aplicações da quitosana na área de alimentos, sua capacidade de formar filmes e coberturas comestíveis como também suas propriedades antimicrobianas, têm destaque neste trabalho de pesquisa.

A quitosana, como ingrediente de coberturas comestíveis, é ideal porque é flexível, transparente e resistente (WILES *et al.*, 2000, p. 1175). Estas características dependerão das concentrações utilizadas, pois segundo Piquero (2010, p. 21), quando se preparam soluções de quitosana em concentrações menores a 1%, estas são pouco viscosas ou diluídas e perdem facilmente sua coesão, e em concentrações entre 2 e 3 % as soluções são de elevada viscosidade, opacas e pouco homogêneas.

Láres-Velásquez (2008, p. 9) indica que antes de aplicar cobertura de quitosana em frutos e vegetais, deve-se considerar: o tipo de quitosana a ser usada (grau de acetilação, peso molecular e procedência), o ácido utilizado para preparar as soluções aquosas¹⁹, o pH do meio, (tendo o cuidado de respeitar o pH natural do produto), a temperatura de armazenamento, a presença de outros compostos no produto (açúcares, sais, proteínas e outros).

¹⁸ Deve-se considerar que as pessoas com alergia a marisco, mulheres grávidas ou mulheres amamentando devem evitar o uso de produtos com quitosana (BARNEY 1998 *apud* RAYBAUDI-MASSILIA, 2009a, p. 169).

¹⁹ Os ácidos orgânicos que ajudam na diluição da quitosana podem ser: ácido acético (PONCE *et al.*, 2008, p. 300; YE; NEETOO; CHEN, 2008, p. 261; BEBERLYA *et al.*, 2008, p. 535), ácido láctico (BEVERLYA *et al.*, 2008, p. 535; DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004, p. 708; JIANG, 2011, p. 21), ácido cítrico (CAMPANIELLO *et al.*, 2008, p. 993).

A cobertura de quitosana permite prolongar a vida de prateleira dos alimentos e controlar a decomposição das frutas, porque diminui as taxas de respiração, inibe o desenvolvimento de fungos e/ou retarda o amadurecimento (reduzindo o etileno e a formação de dióxido de carbono) (NO *et al.*, 2007, p. 92). Láres-Velásquez (2008, p.7) atribui a preservação dos produtos recobertos com a cobertura de quitosana, à modificação da atmosfera interna e da diminuição das perdas por transpiração. Segundo Bai, Huang e Jiang (1988, p. 84) a modificação da atmosfera interna não chega a causar uma respiração anaeróbica, porque estes filmes são mais seletivamente permeáveis ao O₂ do que ao CO₂.

Bosquez *et al.* (2000 *apud* Miranda *et al.*, 2003, p. 331) indicam que a cobertura de quitosana por ser um polissacarídeo, pode reduzir os níveis internos de O₂ e elevar os de CO₂, permitindo prolongar a vida dos produtos frescos, podendo funcionar também como uma barreira contra lipídeos e contra compostos aromáticos, trazendo benefícios ao alimento tais como: a retenção de sabor, da textura, da cor, melhor aparência e redução da deterioração. No entanto, esta cobertura apresenta a desvantagem de ser permeável a umidade, problema que pode ser resolvido com a adição de compostos hidrofóbicos (WILES *et al.*, 2000, p. 1175). Contudo, a eficiência da adição do composto hidrofóbico na cobertura base de um hidrocoloide [Quitosana] dependerá da obtenção de uma capa lipídica homogênea e contínua, dentro ou sobre a matriz hidrocoloide (KARBOWIAK, DEBEAUFORT; VOILLEY, 2007, p. 887).

Existem diversas pesquisas sobre aplicação de coberturas de quitosana para prolongar a vida de prateleira e melhorar a qualidade de frutas inteiras e minimamente processadas, por exemplo: cobertura de quitosana aplicada em pêssegos (*Prunus persica L. Batsch*) armazenados a 23 °C diminuiu a taxa de respiração representada na produção de CO₂, e a firmeza da fruta manteve-se até o final de 12 dias de armazenamento (LI; YU, 2000, p. 271); soluções de quitosana em morangos diminuíram lentamente a respiração, eliminando as perdas por transpiração, a textura se manteve melhor com o tempo, a carga microbiana no tempo permanece mais baixa nos frutos tratados com a quitosana e sensorialmente não há diferenças apreciáveis entre os frutos tratados e os não tratados com quitosana (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004, p. 703); a cobertura de quitosana em morangos reduziu a deterioração e aumentaram a sua vida de prateleira (VARGAS *et al.*, 2006, p. 170).

Segundo os resultados de Gonzales-Aguilar *et al.* (2005, p. 124, 126) a quitosana de médio peso molecular comparada a quitosana de baixo peso molecular e alto, apresenta melhores resultados com relação ao índice de deterioração²⁰, e a perda de firmeza.

Existem também outras pesquisas nas quais a atividade antimicrobiana da quitosana é demonstrada, por exemplo: uma cobertura de quitosana (1,5% w/v) com metil celulose (0,5% w/v) reduziram a população de *E. coli* inoculado em melão minimamente processado armazenado a 10 °C em 1,3 ciclos Log₁₀, no primeiro dia (SANGSUWAN; RATTANAPANONE; RACHTANAPUN, 2008, p. 406). Quitosana (1 e 2%) de baixo e médio peso molecular aplicado como cobertura comestível a mamão armazenado a 5 °C mostra efeito significativo na redução de bactérias mesófilas e fungos (GONZALES-AGUILAR *et al.*, 2005, p. 130).

A ação antimicrobiana da quitosana é influenciada por vários fatores: peso molecular²¹ (JEON; PARK; KIM, 2001, p. 71; NO *et al.*, 2002, p. 71), grau de desacetilação²² (TSAI *et al.*, 2002, p. 175), tipo de bactéria (NO *et al.*, 2002, p. 71), composição química e nutricional do substrato, e condições ambientais (atividade de água, umidade ou ambos) (DUTTA, *et al.*, 2009, 1177). Outro fator importante mencionado por Devlieghere, Vermeulen e Debevere. (2004, p. 711) é que a quitosana tem propriedades bactericidas quando está em meio ácido (pH<5,5).

Uma das hipóteses mais aceita a respeito da atividade antimicrobiana da quitosana, baseia-se em seu efeito sobre a permeabilidade da célula. As interações eletrostáticas da quitosana carregada positivamente (poli-eletrólito catiônico) com as superfícies celulares da bactéria carregadas negativamente, alteram as propriedades da barreira da membrana dos microrganismos, produzindo uma perda de componentes intracelulares como eletrólitos e proteínas (HELANDER *et al.*, 2001, p. 243; JE; KIM 2006 *et al.*, p. 6631, 6632; MUZZARELLI *et al.*, 1990, p. 2022). Segundo Li, Feng e Yang (2010, p. 148) a quitosana primeiramente incrementa a permeabilidade da membrana externa e finalmente interrompe a membrana celular da bactéria.

²⁰ A quitosana de baixo peso molecular não foi capaz de formar um bom filme que restrinja a entrada de oxigênio devido a sua baixa viscosidade, e a quitosana de alto peso molecular favoreceu a uma maior desidratação superficial dos frutos (GONZALES-AGUILAR *et al.*, 2005, p. 124).

²¹ A quitosana de baixo peso molecular possui maior atividade antimicrobiana que a de elevado peso molecular, devido ao número total de grupos amino na molécula (UCHIDA, 1988 *apud* GONZALES-AGUILAR *et al.*, 2005 p. 123; WANG *et al.*, 2011, p. 12413; ZHENG; ZHU, 2003, p. 529).

²² O grau de desacetilação determina o conteúdo de grupos amino no polissacarídeo (GONZALES-AGUILAR *op. cit.*, p. 123).

Em outras pesquisas, foi demonstrado que a atividade antimicrobiana da quitosana é mais efetiva contra bactérias Gram-negativas do que contra bactérias Gram-positivas (CHUNG *et al.*, 2004, p. 936); Zheng e Zhu (2003, p. 528) reportam que a atividade antimicrobiana da quitosana contra bactérias Gram-positivas e contra bactérias Gram-negativas dependerá do peso molecular da quitosana. Em seu trabalho eles estudaram a atividade antimicrobiana da quitosana contra *S. aureus* (Gram-positivo) e *E. coli* (Gram-negativa), e observaram que a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* aumenta com o aumento de peso molecular da quitosana, e que para *E. coli* a atividade antimicrobiana aumenta à medida que diminui o seu peso molecular. Os autores sugerem dois mecanismos diferentes para a atividade antimicrobiana: no caso de *S. aureus*, a quitosana na superfície da célula pode formar um polímero na membrana, que inibe a entrada de nutrientes na célula e, para *E. coli*, a quitosana entra na célula através da permeação.

A atividade fungicida da quitosana também já foi bastante pesquisada. Alguns trabalhos revelaram que a quitosana, controla o crescimento de *R. stolonifer* em tomates armazenados a 14 °C durante 48, 72, e 96 horas (BAUTISTA-BAÑOS; BRAVO-LUNA, 2004, p. 63), tem atividade fungicida em sucos de maçã (ROLLER; COVILL, 1999, p. 67), em frutos de uva (*Vitis vinifera* L.) e em morango apresenta atividade contra *B. cinérea* (ROMANAZZI *et al.*, 2002, p. 1862, 1866).

Um fator importante observado por Zhang e Quantick (1997 *apud* RAMOS-GARCÍA *et al.*, 2010, p 49) é que ao aumentar a concentração da quitosana os efeitos benéficos no controle do microrganismo não aumentam significativamente. Por outro lado, Krasaekoopot e Mabumrung (2008, p. 554, 556) reportam resultados diferentes; eles indicam que existe uma relação direta entre a concentração de quitosana e seu efeito antimicrobiano.

E importante considerar também, que as propriedades antimicrobianas da quitosana em pesquisas realizadas *in vivo*, demonstraram que variam em função do microrganismo e do meio no qual ela se encontra, afetando sua aplicação no alimento (VELEZ- HARO *et al.*, 2010, p. 1190). Isto é explicado pelo fato de que um alimento é uma mistura de diferentes compostos (hidratos de carbono, proteínas, gorduras, minerais, vitaminas sais e outros), os quais podem interagir com a quitosana e produzir a perda ou a melhora do seu potencial antimicrobiano (NO *et al.*, 2007, p.88).

2.5.1.2 *Trans-cinamaldeído*

Na atualidade é conhecida uma ampla variedade de óleos essenciais de origem vegetal, extraídos de diferentes partes da planta, ou seja: flor, caule, folha, fruto, broto, semente e raiz, podendo ser obtidos por fermentação, extração ou destilação sendo o último método o mais utilizado comercialmente (BURT, 2004, p. 224).

Os óleos essenciais são misturas de várias substâncias químicas como: terpenos²³, terpenóides²⁴, phenilpropenes²⁵ e outros constituintes, todos caracterizados pelo seu baixo peso molecular (HYLDGAARD; MYGIND, MEYER, 2012).

O principal componente dos óleos essenciais pode constituir até 85 %, e os outros componentes encontram-se geralmente no nível de traços (BURT, 2004, p. 225; GROSSO *et al.*, 2008 p. 199).

A maioria dos óleos essenciais é considerada como substâncias GRAS, por tanto sua utilização na indústria de alimentos é permitida (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 200-?b). São aplicados principalmente como aromatizantes tanto os óleos essenciais como seus compostos individuais (BURT, 2004, p. 225), e em menor grau como conservantes devido ao forte sabor (LAMBERT *et al.*, 2001, p. 453).

O *trans*-cinamaldeído conhecido também como cinamaldeído²⁶ é uma substância química, presente como componente principal nos óleos a base de canela (FRIEDMAN; KOZUKUE; HARDEN, 2000, p. 5702).

Caracteriza-se por ser um líquido amarelo, oleoso, com um forte cheiro de canela, doce, solúvel em éter e clorofórmio, miscível em álcool e óleos (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES, 2004, p. 13), e tem um ponto de ebulição de 250 °C. (SIGMA-ALDRICH, 2011, p. 4).

Esta substância está aprovada pela FDA para uso em alimentos como aromatizante sintético sendo considerado como aditivo GRAS (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 200-?b).

²³ Exemplos de terpenos incluem p-cimeno, limoneno, terpineno, sabineno e pineno (HYLDGAARD; MYGIND, MEYER, 2012).

²⁴ Os terpenóides pode ser subdivididos em: alcoóis, esterés, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis, e epóxidos. Exemplos de terpenóides: timol, carvacrol, linalol, acetato de linalilo, citrônella, piperitone, mentol, e geraniol (*Id.*, 2012).

²⁵ Exemplos de phenilpropenes: isoeugenol, eugenol, vanilina, safrole e cinamaldeído (*Id.*, 2012).

²⁶ Outros sinônimos: *trans*-Benzenepropenal; (E)-cinamaldeído; *trans*-cinnamic aldeído; (E)-cinnamyl aldeído; (E)-3-phenylacrolein; (E)-3-phenylpropenal; *trans*-3-phenyl-2-propenal; (E)-3-phenylprop-2-enal; (E)-3-phenyl-2-propenal; *trans*-3-phenylpropenal; 2-propenal, 3-phenyl-, (E)-; 2-propenal, 3-phenyl (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES, 2004, p 14).

É utilizado principalmente para conferir sabor de canela em alimentos, bebidas, produtos médicos, perfumes, cosméticos, detergentes, cremes e loções. Diferentes concentrações são utilizadas em alimentos e bebidas, por exemplo: 7,7 ppm em sorvetes, 9 ppm em bebidas não alcoólicas, 20 ppm em condimentos, 60 ppm em carnes, 700 ppm em doces, 2000 ppm em alimentos para bebês e sobremesas, 2200 ppm, em cereais matinais, 3500 ppm em produtos cozidos, 4900 ppm em gomas de mascar, 6400 ppm em sucos de frutas (FENAROLI, 1975, *apud* U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES, 2004, p. 14).

Friedman, Kozukue e Harden (2000, p. 5702) pesquisaram a estabilidade do trans-cinamaldeído a temperatura de aquecimento, encontrando que aproximadamente a partir de 60 °C sofre uma transformação para benzaldeído à medida que o calor aumenta. Esta informação deve ser levada em consideração para decidir em que tipo de alimento pode ser utilizado.

Pesquisas realizadas demonstraram que o trans-cinamaldeído possui qualidades antimicrobianas contra uma ampla gama de patógenos transmitidos por alimentos, como: *Clostridium botulinum* (BOWLES; MILLER, 1993, p. 788), *Staphylococcus aureus* (BOWLES; SACKITEY; WILLIAMS, 1995, p. 344), *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium* (BURT, 2004, p. 235, 237), *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella entérica* (FRIEDMAN; HENIKA; MANDRELL, 2002, p. 1545).

Segundo Ooi *et al.* (2006, p. 511) tanto o óleo de canela como o trans-cinamaldeído apresentam atividade antimicrobiana similares, quase equivalentes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Jia *et al.* (2011, p. 409) ressalta a hidrofobicidade do trans-cinamaldeído, como uma característica importante que permite sua penetração e provoca um distúrbio na bicamada lipídica da membrana celular, causando um aumento da permeabilidade dos prótons, que em última instância levaria a morte da célula bacteriana.

Segundo Hyldgaard, Mygind e Meyer (2012) o trans-cinamaldeído tem um modo de ação não conclusivo e pelo menos três mecanismos podem ocorrer: em baixas concentrações, o trans-cinamaldeído inibe enzimas diferentes envolvidos na citocinese ou em outras funções celulares menos importantes. Em concentrações elevadas, mas sub-letal, atua como um inibidor de ATPase, e em concentrações letais ele altera a membrana celular. Porém, outro mecanismo sugerido, indica que o trans-cinamaldeído contra *E. coli* e *Listeria monocytogenes*, provoca a redução do ATP intracelular pela atividade de ATPase sem alteração significativa da membrana celular (GILL; HOLLEY, 2006, p. 9; RAYBAUDI-MASSILIA, 2007, p. 175). Isto significa que quando o trans-cinamaldeído entra em contato

com a membrana da célula, causa uma ruptura suficiente para dispersar a força motriz de prótons, por vazamento de pequenos íons sem fuga de componente celular grandes, tais como ATP (GILL; HOLLEY, 2004, p. 5755).

Geralmente as pesquisas realizadas sobre a atividade antimicrobiana do trans-cinamaldeído foram realizadas *in vitro* e sua aplicação em alimentos específicos para melhorar a segurança alimentar não tem sido investigada em profundidade. É interessante aplicar-lo em coberturas comestíveis, devido ao seu sabor agradável e boa aceitação entre os consumidores.

2.5.1.3 Coberturas de quitosana com óleos essenciais

Os dados reportados na literatura, da combinação de quitosana com óleos essenciais são diversos e contraditórios.

Pranoto *et al.* (2005, p. 859-865) incorporaram óleo de alho no filme de quitosana²⁷ (1%) e observaram um aumento na eficácia antimicrobiana *in vitro* contra *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*.

Zivanovic, Chi e Draufghon (2005, p. 48) incorporaram óleo essencial de orégano a concentrações de 1 e 2% a filmes de quitosana²⁸, e observaram tanto em testes *in vitro* como *in vivo* (fatias de carne) um efeito inibitório contra *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7.

Hosseine *et al.* (2008, p. 2897) incorporaram óleo de tomilho e cravo a concentrações de 0,5, 1,0, e 1,5 % (v/v) com EDTA (5 mmol), sobre uma matriz de quitosana²⁹ (2% w/v), e conseguiram inibir o crescimento de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enteritidis* e *P. aeruginosa* (*in vitro*).

Xing *et al.* (2011, p. 1446) sugerem que poderia existir uma ação sinérgica entre a cobertura de quitosana³⁰ (1%) e óleo de canela (0,25%), na inibição de crescimento de microrganismos e na manutenção da qualidade das pimentas.

Ojagh *et al.* (2010a, p. 164) analisaram as propriedades antimicrobianas do filme preparado com quitosana³¹ (2% w/v) e óleo de canela a 0,4, 0,8, 1,5 e 2 % (v/v) contra *L. monocytogenes*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *Ps. fluorescens*, *E. coli*, em testes *in vitro* (método de difusão em ágar), e reportaram que o óleo de canela melhora as propriedades antimicrobianas

²⁷ Quitosana de peso molecular entre 900 a 1000 KDa (PRANOTO *et al.*, 2005, p. 860).

²⁸ Quitosana de médio peso molecular (450 KDa) (ZIVANOVIC; CHI; DRAUFGHON 2005, p. 46).

²⁹ Peso molecular não informado (HOSSEINE *et al.*, 2008, p. 2896).

³⁰ Peso molecular não informado (XING *et al.*, 2011, p. 1444).

³¹ Quitosana de médio peso molecular (190-310 KDa) (OJAGH *et al.*, 2010a, p. 162).

da quitosana, e curiosamente reportaram também que seu controle (só filme de quitosana) não apresentava ação antimicrobiana contra estas bactérias.

Ojagh *et al.* (2010b, p. 193) mediram o efeito de uma cobertura de quitosana³² (2% w/v) enriquecida com óleo de canela (1,5%) na qualidade de file de peixe refrigerado e observaram que tanto a cobertura de quitosana e quitosana com óleo de canela apresentaram atividade antimicrobiana contra contagem total de bactérias e contra bactérias psicrófilas. Observaram também que a cobertura de quitosana com óleo de canela apresenta valores melhores, mas similares ao de quitosana para ambos os grupos de bactérias.

Wang *et al.* (2011, p. 12413) estudaram o sinergismo na atividade antimicrobiana de óleo de canela (2.5, 5, 7.5, 10 %) em coberturas de quitosana em testes *in vitro* (teste de difusão em ágar), e observaram que filmes de quitosana de 50 KDa não apresentaram zonas de inibição contra *E. coli*, *S. aureus*, *A. oryzae*, *P. digitatum*. Porém no filme de quitosana com óleo de canela se observou zonas de inibição para *A. oryzae* e *P. digitatum* a partir de uma concentração de 2,5% e para *E. coli* e *S. aureus* a uma concentração de 5%. Eles mostraram que na medida em que se acrescentava a quantidade de óleo as zonas de inibição foram maiores.

Estes pesquisadores estudaram também a dinâmica da atividade antimicrobiana da quitosana com o óleo de canela (10%) durante 27 dias; observaram que o valor máximo de inibição ocorreu no dia 3, depois deste dia a atividade antimicrobiana diminuiu. Também foi observado que o filme de quitosana (matriz) pode reduzir a concentração do óleo libertado (líquido ou gasoso) através das interações entre os óleos e a matriz polimérica, aumentando o tempo de atividade antimicrobiana, devido a que é mantida uma concentração relativamente elevada de óleo no sistema.

Lopez-Mata *et al.* (2012, p. 38) sugerem que a atividade antimicrobiana de uma cobertura de quitosana de peso molecular médio (2%) - amido - óleo de canela (0,1%) aplicada em morangos, tem maior efeito antimicrobiano devido a um sinergismo entre estes compostos. Porém, nesta pesquisa não foi utilizado como controle morangos só com cobertura de quitosana, sendo assim, não há um parâmetro adequado para determinar se houve o sinergismo sugerido pelos autores.

Sanchez-González *et al.* (2010, p. 451) em testes *in vitro* determinaram que a atividade antimicrobiana do filme de quitosana contra *Listeria monocytogenes*, foi melhorado com a adição de óleo essencial de árvore de chá (relação 1:2). Entretanto, as concentrações

³² Quitosana de médio peso molecular (450 KDa) (OJAGH *et al.*, 2010b, p. 194).

baixas (relação 1:0,5 e 1:1) não observaram nenhum efeito significativo com relação ao controle, que já apresentava atividade antimicrobiana.

Hernandez-Alvarado (2009, p. 89) trabalhou com quitosana de baixo peso molecular e óleos essenciais de canela, cravo e tomilho (0,1- 0,3 mg/ml)³³ para reduzir a infecção de *Rhizopus stolonifer* tanto *in vitro* como *in vivo*. Seus resultados mostraram que em testes *in vitro* obtinha-se maior efeito inibitório, no crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer*, quando se misturava a quitosana com os óleos essenciais do que quando se utilizava este polímero de maneira individual; mas, os resultados dos testes *in vivo* (frutos de tomate) não foram os mesmos; só o tratamento com quitosana logrou inibir a infecção de *Rhizopus stolonifer*.

De acordo com Hernandez-Lauzardo *et al.* (2005, p. 202) existem também pesquisas que revelam que quando a quitosana é aplicada de forma individual apresenta melhores resultados antimicrobianos do que quando associada com tratamentos hipobáricos, com extratos vegetais ou com antagonistas microbianos (bactérias ou leveduras). Bautista-Baños *et al.* (2003, p. 1090) quando aplicaram a solução de quitosana (1,5%) nos frutos de mamão inoculados com *C. gloeosporioides*, tiveram uma menor porcentagem de infecção do que quando aplicaram a combinação quitosana com extratos vegetais. Ponce *et al.* (2008, p. 294) reportam que a combinação de quitosana de peso molecular médio (2%) e oleoresina de Rosemary (1%) tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, não aumentou a atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, afastando qualquer efeito aditivo ou sinérgico, mesmo que estes compostos, por si só, apresentassem atividade antimicrobiana *in vitro*.

Os resultados apresentados pelos pesquisadores mencionados nos mostram que concentrações elevadas do óleo essencial são necessárias para obter resultados inibitórios satisfatórios. Porém, concentrações elevadas de óleos essenciais podem afetar as propriedades sensoriais dos alimentos, limitando conseqüentemente, seu uso.

Outra limitação decorrente do uso de concentrações elevadas de óleos essenciais é o risco de toxicidade, pois, segundo Dusan *et al.* (2006, p. 1435, 1443) os óleos essenciais que possuem a capacidade de inibir completamente o crescimento bacteriano a uma concentração de 0,05%, apresentam uma elevada citotoxicidade para as células intestinais do cólon humano cultivadas *in vitro*. Portanto, é necessário encontrar um equilíbrio adequado entre a dose efetiva do óleo essencial, o efeito sobre as propriedades sensoriais dos alimentos e o risco de toxicidade.

³³ Estes valores correspondem a 0,01 – 0,03 % w/v.

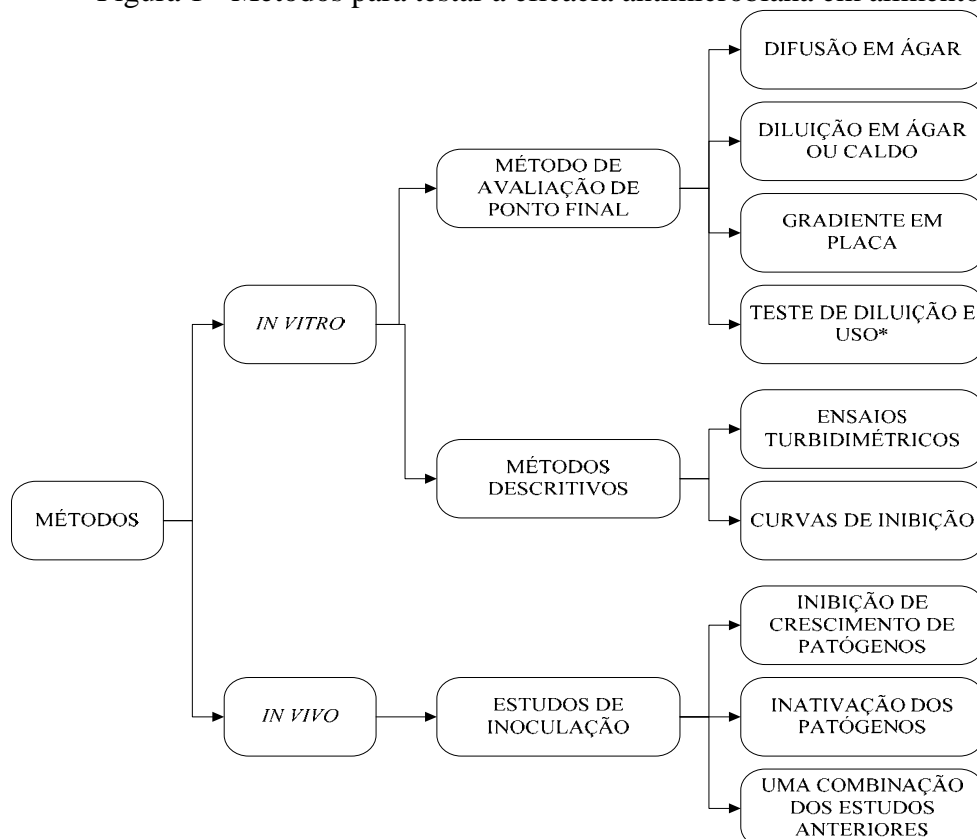
2.6 AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

Existem diversos métodos de ensaio *in vitro* para avaliar a atividade antimicrobiana e muitos deles surgiram devido aos diferentes objetivos e finalidades das pesquisas, porém, isso ocasiona dificuldades na hora de fazer comparações dos resultados publicados.

Outros fatores que podem afetar os resultados obtidos da avaliação da atividade antimicrobiana podem ser: o método utilizado para extrair o óleo essencial, a parte do material vegetal, o volume de inóculo, a fase de crescimento microbiano, o meio de cultura utilizado, o pH dos meios, a escolha do emulsionante, o tempo de incubação e a temperatura (BURT, 2004, p. 228; RIOS; RECIO; VILLAR, 1988, p. 128).

Os métodos utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana podem ser divididos em métodos *in vitro* e em métodos aplicados ou *in vivo*. Tendo como base a classificação feita por Alzamora, Tapia e Lopez-Malo (2000, p. 243) para métodos *in vitro* e pela National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) (2010) para estudos de inoculação em alimentos, é apresentado na Figura 1, um resumo dos principais métodos.

Figura 1 - Métodos para testar a eficácia antimicrobiana em alimentos



Fonte: Adaptada de Alzamora, Tapia e Lopez-Malo (2000, p. 243) e NACMCF (2010).

* O teste de diluição e uso e conhecido também como teste de sanitizantes e desinfetantes.

Os métodos *in vitro* são geralmente feitos em meios de laboratório ou em sistemas modelo, com o propósito de obter informações preliminares sobre a atividade antimicrobiana potencial, enquanto os métodos *in vivo* são aqueles onde o agente antimicrobiano é aplicado ao alimento real e os resultados permitem a avaliação de alguns fatores que podem afetar a eficácia do antimicrobiano.

Nos métodos de avaliação de ponto final, os resultados refletem o poder inibitório do composto, durante um tempo específico.

O método de difusão em ágar pode ser feito por:

- a) teste de difusão em disco, que consiste em aplicar o antimicrobiano ao ágar utilizando um disco de papel filtro impregnado. O composto se difunde através do ágar, estabelecendo-se um gradiente de concentração; Isto é geralmente usado como uma verificação preliminar para atividade antibacteriana antes de estudos mais detalhados, sendo útil para a seleção entre óleos essenciais. Devido à variação de fatores como: os volumes de óleo essencial colocado sobre os discos de papel, a espessura da camada de ágar, e o solvente utilizado, que geram diferentes resultados, a comparação dos dados publicados não é viável (BURT, 2004, p. 228);
- b) teste de poço em ágar, no qual o óleo essencial é depositado dentro dos poços cortados no ágar. Este método pode ser utilizado para rastrear quando se tem um grande número de óleos essenciais e/ou um grande número de isolados de bactérias (DORMAM; DEANS, 2000, p. 309).

O método de diluição em ágar ou caldo gera um dado estatístico que descreve a inibição do microrganismo depois de um tempo determinado de incubação. Este dado se conhece como a concentração inibitória mínima (CIM); a definição da CIM difere entre as publicações, sendo isto outro obstáculo para a comparação entre os estudos. Uma definição amplamente utilizada é que a CIM é a menor concentração que inibe o crescimento visível de um microrganismo (DELAQUIS *et al.*, 2002, p. 103; HAMMER; CARSON; RILEY, 1999, p. 987; KARAPINAR; AKTUG, 1987, p. 163; NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY SCIENCE, 2003, p. 2). Existem também outras denominações que são utilizadas nos testes de atividade antimicrobiana, como a concentração bactericida mínima (CBM), concentração bacteriostática, concentração bactericida, e outros (BURT, 2004, p. 228).

- a) o método de diluição em ágar consiste em incorporar diluições apropriadas de solução antimicrobiana a ágars fundidos (45 a 50 °C) e

quando solidificados adiciona-se o inóculo e se incuba. Os resultados publicados expressos como CIM estão aproximadamente na mesma ordem de magnitude, apesar de que existem variações no solvente utilizado para incorporar o óleo essencial, e o volume do inóculo (BURT, 2004, p. 228);

- b) o método de diluição em caldo pode ser feito mediante varias técnicas: medindo a densidade ótica (a turvação), enumeração de colônias por contagem de viáveis, por medição de condutância/condutividade e por determinação do ponto final (observação visual ou aplicação de microdiluição). Cada uma destas técnicas tem vantagens e desvantagens que devem ser consideradas antes de aplicar-se.

No método gradiente em placa o ágar fundido é vertido em placas de Petri, deixando que solidifique com uma determinada inclinação, logo depois, verte-se uma segunda camada de ágar contendo o antimicrobiano. O resultado é uma caixa com uma gradiente de concentração.

Ao aplicar o teste de diluição e uso, é obtido um coeficiente de fenol através da determinação do recíproco da diluição do composto capaz de matar o microrganismo em 10 minutos.

Dentro da classificação dos métodos *in vitro*, também temos os métodos descritivos, nos quais o crescimento do microrganismo é analisado no tempo dando informação acerca da dinâmica do crescimento, depois de adicionar o antimicrobiano. Pode ser observada a rapidez do efeito bactericida ou a duração do efeito bacteriostático (BURT, 2004, p. 229), estando incluídos os ensaios turbidimétricos e as curvas de inibição.

Em geral um dos fatores que influem nos resultados ao se aplicar os métodos *in vitro* é a utilização ou não de emulsionantes ou solventes para dissolver o óleo essencial ou para estabilizá-lo em meios de cultura á base de água. Pode ser visto em diferentes pesquisas que muitas substâncias têm sido utilizadas para este fim: etanol, metanol, tween-20, tween-80, monolaurato de sorbitano, acetona em combinação com tween-80, polietileno glicol, propileno glicol, n-hexano, dimetil sulfóxido e ágar (RASOOLI, 2007, p. 116).

Os métodos aplicados conhecidos também como *in-vivo*, já contam com um protocolo, que fornece as diretrizes para realizar estudos de desafio e estudos de inativação de patógenos de uma variedade de alimentos (HEALTH CANADÁ, 2010; NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS, 2010).

Este método, dependendo do objetivo do estudo, do tipo de produto e do risco que as bactérias apresentam, pode se subdividir em:

- a) estudos para a inibição de crescimento de patógenos: utilizados para avaliar a capacidade de uma determinada formulação de produto alimentício, com um processo e uma embalagem específica, para inibir o crescimento de algumas bactérias patogênicas, quando são armazenadas em condições pré-determinadas;
- b) estudos da inativação dos patógenos: utilizados para avaliar a capacidade de uma determinada formulação de produto alimentício, ou um processo, para inibir as certas bactérias patogênicas. Neste tipo de estudos deve-se considerar as condições de embalagem e armazenamento;
- c) uma combinação dos estudos anteriores: utilizados para avaliar a capacidade de um determinado alimento, ou processo, para a inativação de certas bactérias patogênicas ou para atingir um nível de inativação seguido por inibição do crescimento de sobreviventes ou contaminantes, introduzidos após o processamento.

Segundo, o protocolo de NACMCF (2010) é necessário considerar: as condições de processo do produto, as cepas, a concentração e o volume do inóculo a utilizar, o tipo e o tempo de amostragem a realizar, os controles em branco que se devem realizar, o tamanho da amostra para cada análise, o método aplicado para inocular o produto alimentício, as condições de embalagem, as condições de incubação do produto inoculado e os métodos de contagem e enriquecimentos aplicados.

Diversas pesquisas demonstraram que quando se testa a ação antimicrobiana por métodos *in vivo*, uma concentração maior de óleos essenciais é necessária para alcançar o mesmo efeito obtido em testes realizados por métodos *in vitro*; devido às interações do antimicrobiano com os diferentes compostos do alimento (BURT, 2004, p. 232).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA PRIMA

3.1.1 Melões

Os melões “*Cantaloupe*” (*Cucumis melo* L.) foram adquiridos no comércio local, sendo previamente selecionados em relação ao estado de maturação (cor amarela clara, com uma rede bem formada e realçada na superfície da fruta, ausência de defeitos na superfície, firme, sem sementes soltas ou acumulação de líquido na cavidade interna), de tamanho uniforme e com peso aproximado de 2 kg.

Foram transportados em caixas plásticas até o Laboratório Experimental do Departamento de Economia Doméstica e armazenados sob refrigeração (7°C) até o início do processo.

3.1.2 Insumos da cobertura

Foram utilizados os seguintes produtos:

- a) quitosana de médio peso molecular (Cod.: 448877, Sigma Aldrich);
- b) ácido acético glacial³⁴ (Vetec);
- c) glicerol (Vetec);
- d) tween 20[®] (Cod.: 93773, Sigma Aldrich);
- e) trans-cinamaldeído 99% (Cod.: 80687, Sigma Aldrich).

3.1.3 Embalagem e utensílios

Foram utilizados as seguintes embalagens e utensílios:

- a) bandejas com tampa de polietileno tereftalato (PET) com dimensões: 8 x 8 x 5 cm;
- b) tela de aço inox com orifícios de 1,5 cm de diâmetro, com dimensões: 32 x 21 x 10,5 cm;

³⁴ Pesquisas demonstraram que cobertura de quitosana com ácido acético é mais eficiente na redução de *L. monocytogenes* que quitosana com ácido láctico (BEVERLYA *et al.*, 2008, p. 536).

c) bandejas de aço inox de 34 x 26 x 6 cm.

3.1.4 Cepas

As seguintes cepas foram utilizadas: *Escherichia coli* (ATCC 25922TM) como substituto de *Escherichia coli* O157:H7 (NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS, 2010, p.147) e *Listeria innocua* (ATCC 33090), como substituto de *Listeria monocytogenes* (HEALTH CANADÁ, 2010, p. 4; NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS, 2010, 147; SOMMERS; GEVEKE; FAN, 2008, p. 73).

3.2 PREPARO DOS INÓCULOS

As cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922TM) e *Listeria innocua* (ATCC 33090) liofilizadas foram submetidas ao protocolo, conforme recomendado pelo fabricante Microbiologics.

- 1) A partir de um cultivo de *Escherichia coli*, *Listeria innocua* em ágar tripticase de soja-extrato de levedura (TSA-YE/Difco) de 24 horas de incubação a 35 °C foram selecionadas quatro colônias bem isoladas de 2 mm de diâmetro de *E. coli* e transferidas para um tubo de 4 ml de caldo tripticase de soja (TSB/Difco) e uma colônia bem isolada de 1 mm de diâmetro de *L. innocua* foi inoculada para outro tubo de 4 ml de caldo tripticase de soja (TSB/Difco);
- 2) As culturas foram incubadas a 35°C durante 2 horas para a cultura de *E. coli* e 23 horas para a cultura de *L. innocua* para obtenção de uma concentração final em torno de 3×10^8 UFC/ml para cada microrganismo³⁵;
- 3) As concentrações dos inóculos foram ajustadas com água peptonada 0,1 % (Difco) fazendo-se diluições, até 10^5 UFC/ml para a determinação da concentração inibitória mínima e até 10^7 UFC/ml para o ensaio de inoculação (para que ao inocular esta concentração em cada amostra de 50g de melão se obtivesse uma contagem final de 10^5 UFC/g)³⁶.
- 4) As concentrações foram confirmadas realizando-se contagens de colônias viáveis em ágar tripticase de soja-extrato de levedura (TSA-YE/Difco).

³⁵ Este tipo de crescimento foi padronizado, depois da realização de varios testes preliminares.

³⁶ Determinado através de ensaios preliminares

3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A determinação da CIM e CBM do trans-cinamaldeído foi realizado duas vezes em dias distintos e em duplicata, utilizando-se uma combinação dos métodos de diluição em caldo de Kim, Marshall e Wei, 1995 e método de Ham 2006:

- a) foi preparada uma solução antimicrobiana base de concentração 1M, segundo o método descrito por Ham (2006, p. 51) na qual 1,27 ml de trans-cinamaldeído é dissolvido numa mistura de 9 ml de água estéril contendo 0,1 g de Tween 20 (1% w/v)³⁷ e 1 ml de etanol. Em seguida a solução antimicrobiana base foi sonicada por 10 minutos utilizando-se um sonicador (Ultra cleaner/ 1400A), para aumentar a solubilidade do trans-cinamaldeído no solvente;
- b) segundo o método descrito por Kim, Marshall e Wei (1995, p. 2840) foram preparados tubos de ensaio contendo 9,8 ml de caldo tripticase de soja (TSB/Difco) estéril, aos quais foram adicionados uma alíquota de 100 µL da suspensão bacteriana em concentração 10⁵ UFC/ml.³⁸ A seguir, adicionou-se a solução antimicrobiana base preparada anteriormente³⁹, de tal modo que as concentrações finais nos caldos fossem: 150, 200, 250, 500, 1000, 2000 µg/ml (0,015; 0,02; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 % w/v, respectivamente);
- c) os tubos foram incubados a 35 °C durante 24 horas, sob condições de agitação (200 rpm), utilizando uma incubadora de bancada com agitação (CT712/ Cientec);
- d) em seguida, os tubos foram examinados visualmente (verificação de turbidez) para determinar em quais concentrações do caldo ocorre crescimento. A menor concentração na qual não se observou crescimento (turbidez) foi estabelecida como a concentração inibitória mínima (KIM; MARSHALL; WEI, 1995, p. 2840; HAMMER; CARSON; RILEY, 1996, p. 188).

A CIM é a menor concentração do antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo, sendo considerada a concentração mínima que

³⁷ O emulsificador Tween 20 é adicionado para aumentar a solubilidade dos compostos hidrofóbicos e ajudar em sua penetração na parede celular e membrana da bactéria (KIM; MARSHALL; WEI, 1995, p. 2844).

³⁸ Nível de inóculo recomendado para poder avaliar os agentes antimicrobianos segundo Health Canadá (2010, p. 7); NACMCF (2010, p. 148).

³⁹ Esta solução foi preparada momentos antes da utilização (KIM; MARSHALL; WEI, *op. cit.*, p. 2839).

mantém ou reduz a viabilidade do inóculo (HAMMER; CARSON; RILEY, 1996, p. 188);

- e) a partir das concentrações que não apresentaram turbidez, foram inoculados 100 µL do caldo em placas com ágar soja tripticase-extrato de levedura (TSA-YE/Difco) e espalhado com alça de Dringalsky. As placas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas e foram observadas para detectar se houve crescimento bacteriano.

A CBM foi definida como a concentração mínima na qual o crescimento bacteriano não foi detectado (RAYBAUDI-MASSILIA; MOSQUEDA-MELGAR; MARTÍN-BELLOSO, 2006, p. 1580);

- f) foram realizados os seguintes controles:
- controle do meio de cultura;
 - controle do meio de cultura + solução antimicrobiana em diferentes concentrações;
 - controle positivo (meio de cultura + inóculo bacteriano).

3.4 PREPARAÇÃO DAS COBERTURAS COMESTÍVEIS

Foi preparada uma cobertura de quitosana (matriz) e outra de quitosana com trans-cinamaldeído.

A cobertura comestível de quitosana foi elaborada, segundo a formulação apresentada na Tabela 2, dissolvendo-se a quitosana de médio peso molecular em água destilada e ácido acético. Esta solução foi agitada até atingir a dissolução total dos componentes usando um homogeneizador Ultra Turrax T18 Basic (IKA®-Werke), (Figura 2) com um dispositivo (S18N-10G) a 7000 rpm⁴⁰ durante 2 horas à temperatura ambiente (18 °C). Logo após, adicionou-se glicerol e agitou-se a solução durante meia hora na mesma velocidade. No final obteve-se uma mistura homogênea de cor amarela clara translúcida, apresentando pH 4,52.

⁴⁰ Velocidade adotada para evitar a formação de bolhas na solução.

Tabela 2 - Formulação da cobertura comestível de quitosana

Ingredientes	% (w/w)	Pesos (g)
Quitosana ⁴¹	2	50
Acido acético ⁴²	1	25
Glicerol ⁴³	1,5	37,5
Água destilada	95,5	2387,5

Fonte: Própria do autor (2012).

Figura 2 - Preparação das coberturas comestíveis



Fonte: Própria do autor (2012).

Na Tabela 3 é apresentada a formulação da cobertura comestível de quitosana com trans-cinamaldeído, a qual foi elaborada dissolvendo-se quitosana de médio peso molecular em água destilada, ácido acético e Tween 20. Esta solução foi agitada até atingir a dissolução total dos componentes usando um homogeneizador Ultra Turrax T18 Basic (IKA®-Werke), com um dispositivo (S18N-10G) a 7000 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente. Logo após, adicionou-se glicerol e agitou-se novamente a solução durante meia

⁴¹ Porcentagem utilizada por apresentar bons resultados (GONZALES-AGUILAR *et al.* 2005, p. 131; PIQUERO, 2010, p. 21).

⁴² Porcentagem utilizada por vários pesquisadores. (BEBERLYA *et al.*, 2008, p. 535; PONCE *et al.*, 2008, p. 300; YE; NEETOO; CHEN, 2008, p. 261).

⁴³ Porcentagem utilizada por vários pesquisadores. (RAYBAUDI-MASSILIA; MOSQUEDA-MELGAR; MARTIN-BELLOSO, 2008, p. 314; RAYBAUDI-MASSILIA *et al.*, 2007, p. 168; ROJAS-GRAU *et al.*, 2007b, p. 256).

hora, na mesma velocidade. Finalmente, adicionou-se o trans-cinamaldeído na concentração determinada como eficiente no teste de CBM, agitando-se por mais meia hora na mesma velocidade. A solução final resultou homogênea, de cor amarela clara translúcida, apresentando pH 4,54.

Tabela 3 - Formulação da cobertura comestível de quitosana com trans-cinamaldeído

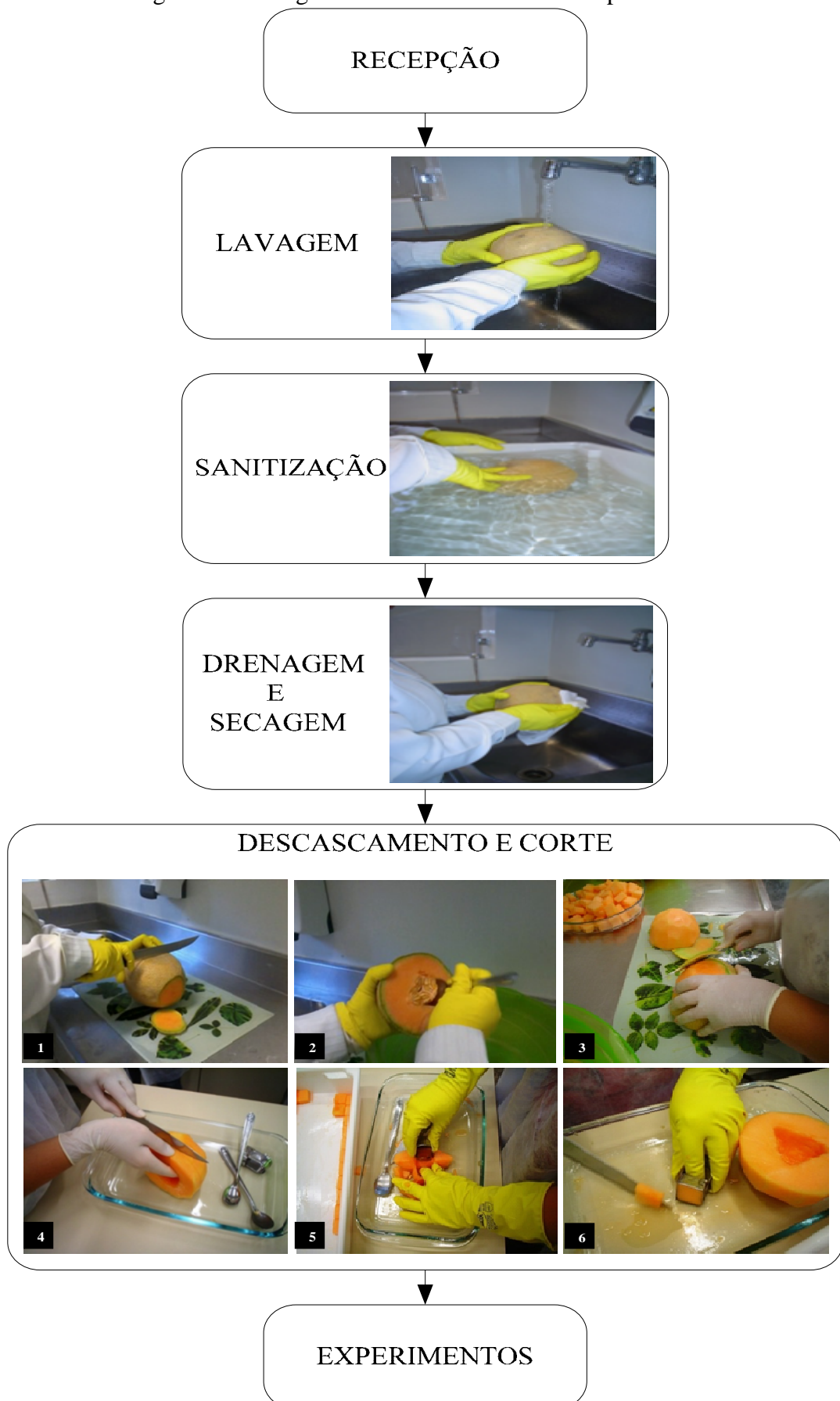
Ingredientes	% (w/w)	Pesos (g)
Quitosana	2	50
Acido acético	1	25
Tween 20	0,3	7,5
Glicerol	1,5	37,5
Água destilada	95,5	2378,8
Trans-cinamaldeído (w/v)	0,05	1,25

Fonte: Própria do autor (2012).

3.5 PROCESSAMENTO DO MELÃO MINIMAMENTE PROCESSADO

O processamento foi realizado em ambiente climatizado (18 °C), cumprindo-se as condições de Boas Práticas de Produção, segundo o fluxograma apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma do melão minimamente processado



Fonte: Própria do autor (2012).

3.5.1 Recepção

Os melões foram retirados do refrigerador e avaliados em relação a sua integridade física.

3.5.2 Lavagem

Foram lavados com água corrente durante 1 minuto aproximadamente.

3.5.3 Sanitização

Os melões foram imersos em uma solução sanitizante clorada (Nippo-Clor) a uma concentração de 200 mg.L^{-1} de cloro por um período de 10 minutos a $15 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.5.4 Drenagem e secagem

Os melões foram colocados em uma bandeja e posteriormente secos com auxílio de papel absorvente.

3.5.5 Descascamento e corte

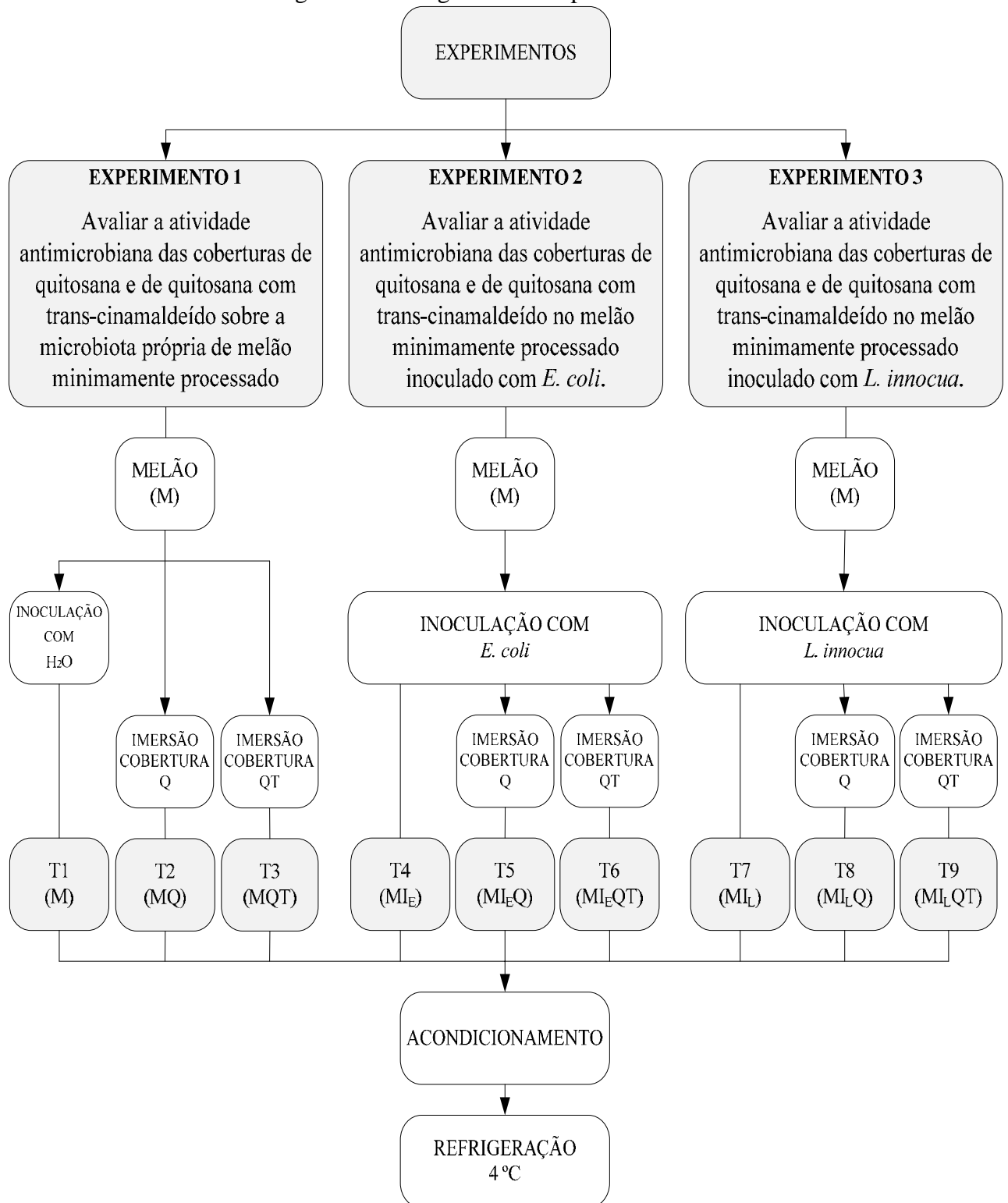
Primeiramente foi realizado o corte das regiões basal e apical do melão. Em seguida cortou-se a fruta pela metade de forma transversal, retirando-se as sementes e descascando.

Uma vez realizado o processo de descascamento, cortou-se manualmente (utilizando uma faca afiada) fatias de 2 cm de largura aproximadamente e a partir destas obtiveram-se pedaços de melão de $2,5 \times 2,5 \text{ cm}$ e $1,4 \text{ cm}$ de altura, com auxílio de um gabarito de aço inoxidável com referida dimensão. A dimensão especificada foi estipulada para que cinco pedaços de melão pesassem aproximadamente 50 g.

3.5.6 Delineamento dos experimentos

Foram conduzidos três experimentos, com objetivos distintos, cada um com três tratamentos, de acordo com a Figura 4. Cada experimento foi realizado duas vezes em dias distintos.

Figura 4 - Fluxograma dos experimentos



Fonte: Própria do autor (2012).

M: melão minimamente processado, Q: cobertura de quitosana, QT: cobertura de quitosana com trans-cinamaldeído, MQ: melão minimamente processado com cobertura de quitosana, MQT: melão minimamente processado com cobertura de quitosana com trans-cinamaldeído, MI_E: melão minimamente processado inoculado com *E. coli*, MI_EQ: Melão minimamente processado inoculado com *E. coli* e com cobertura de quitosana, MI_EQT: Melão minimamente processado inoculado com *E. coli* e com cobertura de quitosana com trans-cinamaldeído, MI_L: Melão minimamente processado inoculado com *L. innocua*, MI_LQ: Melão minimamente processado inoculado com *L. innocua* e com cobertura de quitosana, MI_LQT: Melão minimamente processado inoculado com *L. innocua* e com cobertura de quitosana com trans-cinamaldeído.

Os melões minimamente processados foram separados de formas distintas em função do tratamento a ser submetido:

- melões a serem inoculados e sem cobertura (T1, T4 e T7) foram colocados em bandejas PET (5 pedaços/ por bandeja);
- melões a serem imersos em cobertura (T2, T3, T5, T6, T8 e T9) foram colocados em fileiras de cinco pedaços, em toda extensão da tela de aço inox.

3.5.6.1 Inoculação

Foram utilizadas as recomendações de NACMCF (2010, p. 149-150) e de Health Canadá (2010, p. 10), tendo sido efetuada em cabine de fluxo laminar (Pachane Biotecnologia/PA 40 ESP) (Figura 5).

Figura 5 - Inoculação do melão minimamente processado



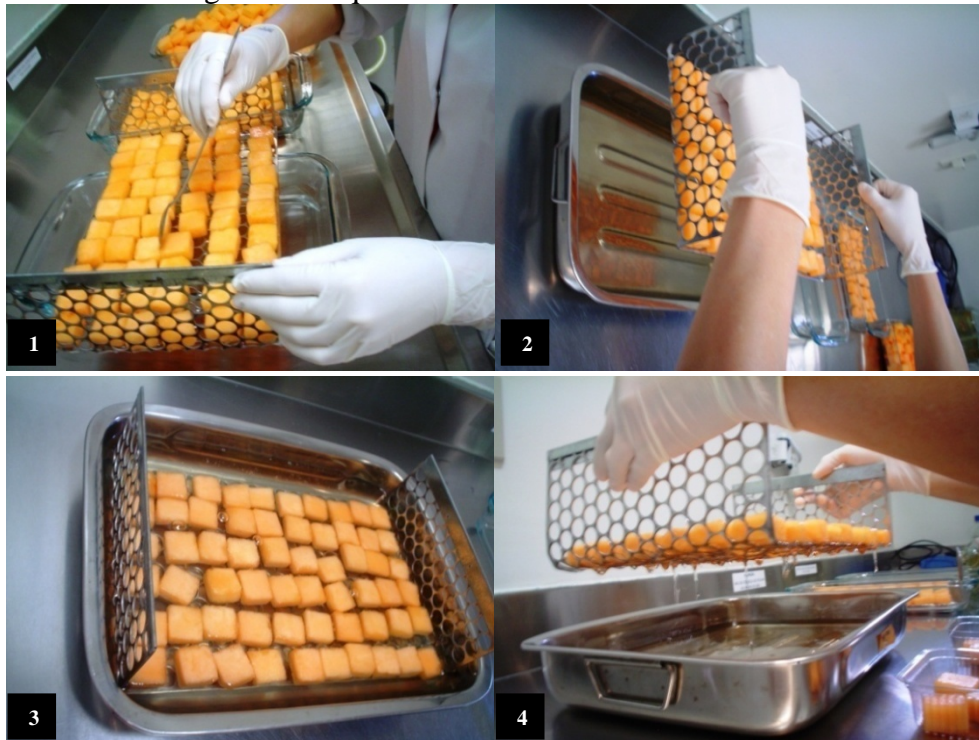
Fonte: Própria do autor (2012).

Na superfície de cinco pedaços de melão, totalizando aproximadamente 50 g, foi inoculado, com uma micropipeta estéril, 500 μL da cultura (10^7 UFC/ml), ou de água estéril (controle) deixando as amostras em repouso por 30 minutos para total absorção.

3.5.6.2 Imersão na cobertura e drenagem

Os pedaços de melão foram distribuídos em tela de aço inox, em fileiras de 5, e imersos na cobertura comestível conforme o tipo de tratamento (item 3.5.6), Figura 6.

Figura 6 - Seqüência de Imersão na cobertura comestível



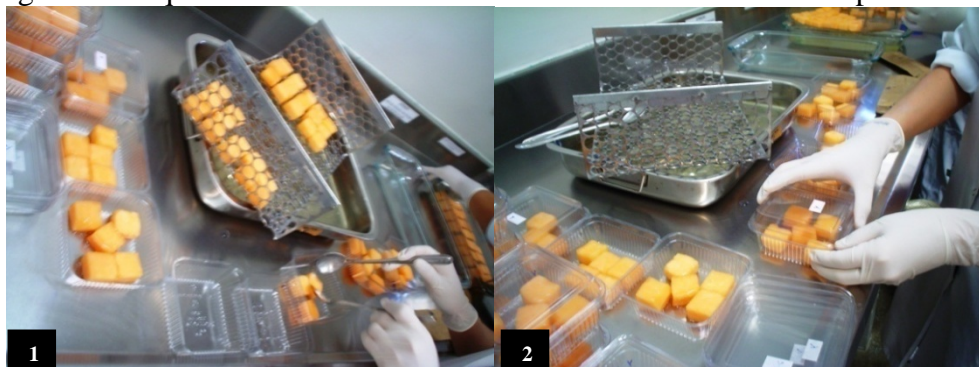
Fonte: Própria do autor (2012).

A imersão foi realizada durante, aproximadamente, 2 minutos, a uma temperatura de 18°C, sendo em seguida efetuada a drenagem para a eliminação do excesso de cobertura por aproximadamente 5 minutos. Cabe ressaltar que para cada tratamento foi preparada uma cobertura.

3.5.7 Acondicionamento

Cinco pedaços de melão minimamente processado com um peso total de aproximadamente 50 g (correspondente a uma fileira) foram colocados dentro de uma bandeja PET, previamente codificada (Figura 7).

Figura 7 - Seqüência de acondicionamento do melão minimamente processado



Fonte: Própria do autor (2012).

3.5.8 Refrigeração

Os melões minimamente processados e acondicionados foram armazenados em câmara BOD (Logem Scientific/LS 550) a uma temperatura de 4 °C durante 21 dias.

3.6 ANÁLISES

3.6.1 Análises microbiológicas

Foi efetuado o teste de presença e ausência de *Escherichia coli* segundo APHA (2001) e de *Listeria spp.* segundo o método MFHPB-30 (HEALTH PROTECTION BRANCH, 2001), nos melões minimamente processados correspondentes ao T1 (Figura 4).

Para avaliação dos experimentos foram retiradas ao acaso duas bandejas de melão e analisadas em duplicata nos tempos: 0, 3, 7, 14, 21 dias de armazenamento a 4 °C. Em função do tipo de experimento foram realizadas análises distintas.

3.6.1.1.1 Presença ou ausência de *Escherichia coli* em melões minimamente processados

Foi efetuado segundo o Método do Numero mais provável (NMP) utilizando-se caldo lauril sulfato triptose (LST/Merck) para o teste presuntivo; caldo *E. coli* (EC/Difco) para o teste confirmativo, com posterior estriamento em ágar levine eosina azul de metileno (L-EMB) para teste completo. O resultado foi expresso como presença ou ausência de *E. coli*/g de melão.

3.6.1.1.2 Presença ou ausência de *Listeria spp.* em melões minimamente processados

Foram transferidos 25 g da amostra para caldo de enriquecimento de *Listeria* (LEB/Difco) e incubou-se a 30 °C/48 h. Após a incubação 0,1 ml foi transferido para 10 ml de caldo fraser modificado (MFB/Difco) e incubou-se a 35 °C/24-26h. Uma alçada foi estriada depois de 24 horas de incubação no caldo LEB e depois de 24-26 horas de incubação no caldo (MFB) em ágar oxford (OXA/Oxoid) e ágar palcam (PAL/Difco). As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 24- 48 horas, sendo o resultado expresso como presença ou ausência de *Listeria spp*/g de melão.

3.6.1.2 Experimento 1

Foram realizadas as seguintes determinações: contagens de bactérias mesófilas, psicrófilas, coliformes totais e *E. coli*, bolores e leveduras, segundo American Public Health Association (APHA, 2001).

3.6.1.2.1 Preparo das diluições

Foram transferidas 25 g de melão para 225 ml de água peptonada 0,1 % (Difco) e após homogeneização foram preparadas diluições até 10^7 .

3.6.1.2.2 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas

Foi inoculado 1 ml de cada diluição, em placa petrifilm AC, em duplicata, aplicado o difusor, e incubado a 35 ± 1 °C por 48 ± 2 h. As contagens foram expressas em UFC/g de melão.

3.6.1.2.3 Contagem de bactérias psicrófilas

Para cada diluição, na superfície de cada placa de ágar padrão (PCA/Oxoid) foi inoculado em duplicata volumes de 0,3-0,3-0,3 e 0,1 ml e espalhou-se com alça Drigalski. As placas foram incubadas a 7 ± 1 °C por 10 dias, sendo as contagens expressas em UFC/g de melão.

3.6.1.2.4 Contagem de coliformes totais e *E. coli*

Foi inoculado 1 ml de cada diluição em duplicata, em placa petrifilm EC, aplicou-se o difusor e incubou-se a 35 ± 1 °C por 48 ± 2 h. As colônias típicas foram contadas e o resultado expresso em UFC/g de melão.

3.6.1.2.5 Contagem de bolores e leveduras

Para cada diluição, na superfície de cada placa de ágar dicloram rosa de bengala cloranfenicol (DRBC/Difco) foi inoculado em duplicata volumes de 0,3-0,3-0,3 e 0,1 ml e

espalhou-se com alça Drigalski. As placas foram incubadas a 25 ± 1 °C por 5 dias e o resultado da contagem foi expresso em UFC/g de melão.

3.6.1.3 Experimentos 2 e 3

Foram realizadas as seguintes determinações: contagem de *E. coli* (APHA, 2001) e contagem de *Listeria spp.* (MFLP-74 - HEALTH PROTECTION BRANCH 2011).

3.6.1.3.1 Preparo das diluições

Cinquenta gramas de melão (correspondente a uma bandeja) foram transferidas para 450 ml água peptonada 0,1 % (Difco) e homogeneizadas com stomacher (Aes chemunex, France) por 1 min. Em seguida foram preparadas diluições até 10^4 para *E. coli* e 10^6 para *Listeria*.

3.6.1.3.2 Contagem de *Escherichia coli*

A partir de cada diluição foi inoculado em duplicata volumes de 0,3-0,3-0,3 e 0,1 ml na superfície de cada placa de ágar MacConkey (Difco) e espalho-se com alça Drigalski. As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 24 horas e o resultado foi expresso em UFC/g de melão.

3.6.1.3.3 Contagem de *Listeria spp.*

A partir de cada diluição foi inoculado em duplicata volumes de 0,3-0,3-0,3 e 0,1 ml na superfície de cada placa de ágar oxford (OXA/Difco) e espalho-se com alça Drigalski. As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 24- 48 horas. As contagens foram expressas em UFC/g de melão.

3.7 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A polpa de melão foi analisada determinando-se: acidez, pH e sólidos solúveis segundo as metodologias do Instituto Adolfo Lutz (IAL) (2008).

3.7.1 Acidez titulável

A determinação da acidez titulável foi realizada por titulometria, utilizando-se 10 g de amostra. A titulação foi feita com uma solução de NaOH 1 N e fenolftaleína (1%) como indicador, sendo o resultado expresso em % de ácido cítrico.

3.7.2 pH

O pH foi determinado através de leitura direta, em potenciômetro de marca WTW (330i/SET), calibrado previamente com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

3.7.3 Sólidos solúveis totais (SST)

O teor de SST foi determinado por refratometria, utilizando-se um refratômetro digital (Atago PR1010) com escala de 0 a 45 °Brix. Os resultados foram expressos em °Brix.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada experimento foi conduzido segundo delineamento fatorial inteiramente casualizado com parcela subdividida, com três tratamentos nas parcelas e o tempo de armazenamento (0, 3, 7, 14, 21 dias) nas subparcelas, com duas repetições, duas unidades de amostras e cada uma em duplicata.

Os resultados das contagens dos microrganismos estudados foram transformados em logaritmos de base 10 para realização das análises estatísticas, tendo sido adotado o valor 10 para valores <10 UFC/g.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, por análise de interação tratamento x tempo, e quando conveniente feito teste de tuckey a nível de confiança de 0,1% de probabilidade através do programa estatístico SAS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MELÃO

Na Tabela 4 são apresentados os resultados das análises físico-químicas do melão utilizado neste experimento.

Tabela 4 - Resultados das análises físico-químicas do melão

Acidez total titulável (% de ácido cítrico)	pH	Sólidos solúveis totais (°Brix)
0,06 ± 0,00	6,53 ± 0,09	8,56 ± 0,49

Fonte: Própria do autor (2012).
Médias seguidas de desvios padrões.

Os resultados de acidez total titulável 0,06, pH 6,53 e sólidos solúveis 8,56 correspondem aos valores reportados para melão em estado comercial de maturidade, obtidos também por outros pesquisadores (GARCIA *et al.*, 2009, p. 153, 155; MACHADO; ALVES; FIGUEIREDO, 2008, p. 572; MILLAM-TRUJILLO *et al.*, 2001, p. 176).

O pH e sólidos solúveis presentes no melão, aliados a outros parâmetros intrínsecos e extrínsecos, oferecem condições favoráveis ao crescimento de microbiano.

4.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A CIM é a menor concentração do antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo (HAMMER; CARSON; RILEY, 1996, p. 188), podendo-se observar na Tabela 5 que o efeito do trans-cinamaldeído para *E. coli* foi de 500 µg/ml e para *L. innocua* a 200 µg/ml. Estes resultados demonstram que o trans-cinamaldeído tem efeito inibitório mais eficiente contra *L. innocua* (Gram positiva) do que contra *E. coli* (Gram negativa).

Segundo as indicações da National Committee for Clinical Laboratory Science (NCCLS)⁴⁴, a CIM não representa um valor absoluto, sendo a “verdadeira” CIM um ponto entre a menor concentração do teste que inibe o crescimento do organismo (ou seja, a leitura da CIM) e a próxima menor concentração do teste. Portanto neste experimento a verdadeira CIM do trans-cinamaldeído contra *E. coli* está entre 500 e 250 µg/ml e para *L. innocua* está entre 200 e 150 µg/ml. Este comportamento pode ser observado na Tabela 5 em que a 250 µg/ml para *E. coli* e 150 µg/ml para *L. innocua* existe ação inibitória em uma das repetições.

Tabela 5 - Concentração inibitória mínima do trans-cinamaldeído contra *E. coli* e *L. innocua*

Microrganismo	Concentração (µg/ml)	CIM				Resultado
		Repetição				
		1	2			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	150	+	+	+	+	+
	200	+	+	+	+	+
	250	+	+	-	-	+
	500	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	150	+	+	-	-	+
	200	-	-	-	-	-
	250	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-

Fonte: Própria do autor (2012).

+: Crescimento do microrganismo (turbo).

-: Sem crescimento o microrganismo (não turbo).

Segundo a NCCLS, mesmo que se trabalhe em condições de rígido controle este tipo de teste pode não fornecer o mesmo ponto final toda vez que o teste é realizado. Em geral a reprodutibilidade aceitável do teste fica dentro de uma diluição $2X^{45}$ do verdadeiro ponto final.

⁴⁴ Para determinações das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das bactérias aeróbicas por macrodiluição em caldo, microdiluição em caldo e diluição em ágar (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY SCIENCE, 2003, p. 3).

⁴⁵ Diluição 2X são as utilizadas geralmente para determinar CIM, e consiste em diluir em série indexada à base 1 (ex., 1, 2, 4, 8, 16 µg/ml) (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY SCIENCE, 2003, p. 3).

A CBM é a concentração mínima na qual o crescimento bacteriano não foi detectado (RAYBAUDI-MASSILIA; MOSQUEDA-MELGAR; MARTÍN-BELLOSO, 2006, p. 1580). Na Tabela 6 pode ser verificado que a 500 µg/ml de trans-cinamaldeído não foi detectado o crescimento de *E. coli* assim como de *L. innocua*.

Tabela 6 - Concentração bactericida mínima do trans-cinamaldeído contra *E. coli* e *L. innocua*

Microorganismo	Concentração (µg/ml)	CBM				Resultado
		População sobrevivente (UFC/ml)				
		Repetição				
		1	2	3	4	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	250	Inc	Inc	<10	<10	
	500	<10	<10	<10	<10	<10
	1000	<10	<10	<10	<10	
	2000	<10	<10	<10	2,0x10 ¹	
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	150	Inc	Inc	9,9x 10 ²	1,0x10 ¹	
	200	Inc	1,5x10 ²	1,3x10 ³	2,0x10 ¹	
	250	2,0x10 ¹	3,0x10 ¹	<10	2,0x10 ¹	
	500	<10	<10	<10	<10	<10
	1000	<10	<10	<10	<10	
	2000	<10	<10	<10	<10	

Fonte: Própria do autor (2012).

Inc.: Incontável.

<10: Crescimento não detectado.

Os resultados mostram que para *E. coli* a CIM corresponde a CBM (500 µg/ml), indicando possivelmente que o efeito é bactericida nesta concentração⁴⁶, e para *L. innocua* a CIM (200 µg/ml) e a CBM (500 µg/ml) são diferentes, sugerindo que o trans-cinamaldeído a 200 µg/ml exerce um efeito bacteriostático⁴⁷ neste microrganismo.

Kim, Park e Park (2004, p. 108) sugeriram também que a atividade antimicrobiana do aldeído cinâmico purificado a partir de *Cinnamomun cassia*⁴⁸ contra *E. coli* é bactericida. Eles observaram no microscópio eletrônico que as células tratadas com o antimicrobiano foram gravemente danificadas e destruídas na estrutura superficial a uma concentração de 1000 µg/ml. Além disso, determinaram pelo método de diluição em caldo a CIM do aldeído cinâmico contra várias linhagens de *E. coli* patogênicas e os resultados mostraram que a CIM

⁴⁶ Bactericida: que mata as bactérias vivas o alguma fração destas (GOY; BRITTTO; ASSIS, 2009, p. 241).

⁴⁷ Bacteriostático: que impede o crescimento de bactérias (*Id.*, 2009, p. 241).

⁴⁸ Composto com similar estrutura ao trans-cinamaldeído, é um congênere (CHANG; CHEN; CHANG, 2001, p. 126).

para *E. coli* O157:H7 e O26 foi 250 µg/ml, para *E. coli* ATCC 11105 e O111 foi 500 µg/ml. Também compararam a CIM do aldeído cinâmico (250 µg/ml) com a CIM de ácido sórbico (500 µg/ml), ácido desidroacético (500 µg/ml) e ácido benzóico (1000 µg/ml) contra *E. coli* O157:H7, concluindo que o aldeído cinâmico tem a menor CIM.

Chang, Chen e Chang (2001, p. 126) determinaram a CIM de cinamaldeído⁴⁹ extraído de *Cinnamomun osmophloeum* contra *E. coli*, pelo método de diluição em caldo, encontrando que a uma concentração de 500 µg/ml inibe-se o crescimento desta bactéria.

Para Ham (2006, p. 57), uma concentração de 250 µg/ml de trans-cinamaldeído “inibe completamente” a *L. innocua* 33090. Este pesquisador definiu a CIM como a mais baixa concentração do composto ativo que resulta num crescimento insignificante. O conceito de CIM utilizado por este pesquisador é semelhante ao conceito da CBM utilizado nesta pesquisa. Ao comparar o resultado obtido por Ham com o resultado de CBM para *L. innocua* (500 µg/ml), observa-se que existe uma diferença, podendo esta ser atribuída principalmente ao método utilizado para detectar o crescimento do microrganismo (turbidez) no meio, porque as outras variáveis (preparação da solução antimicrobiana e o método para determinar a atividade antimicrobiana - diluição em caldo) foram as mesmas.

Para determinação da CIM e CBM foi utilizada uma cultura de 10⁵ UFC/ml, sendo efetuada a análise do crescimento bacteriano através de contagens em placas cujo limite de detecção é de 10¹ UFC/ml e não por espectrofotômetro, uma vez que segundo Kim, Marshall e Wei (1995, p. 2843) são necessárias concentrações de cultura bacteriana de 10⁶ – 10⁷ UFC/ml, para ser detectado por este equipamento.

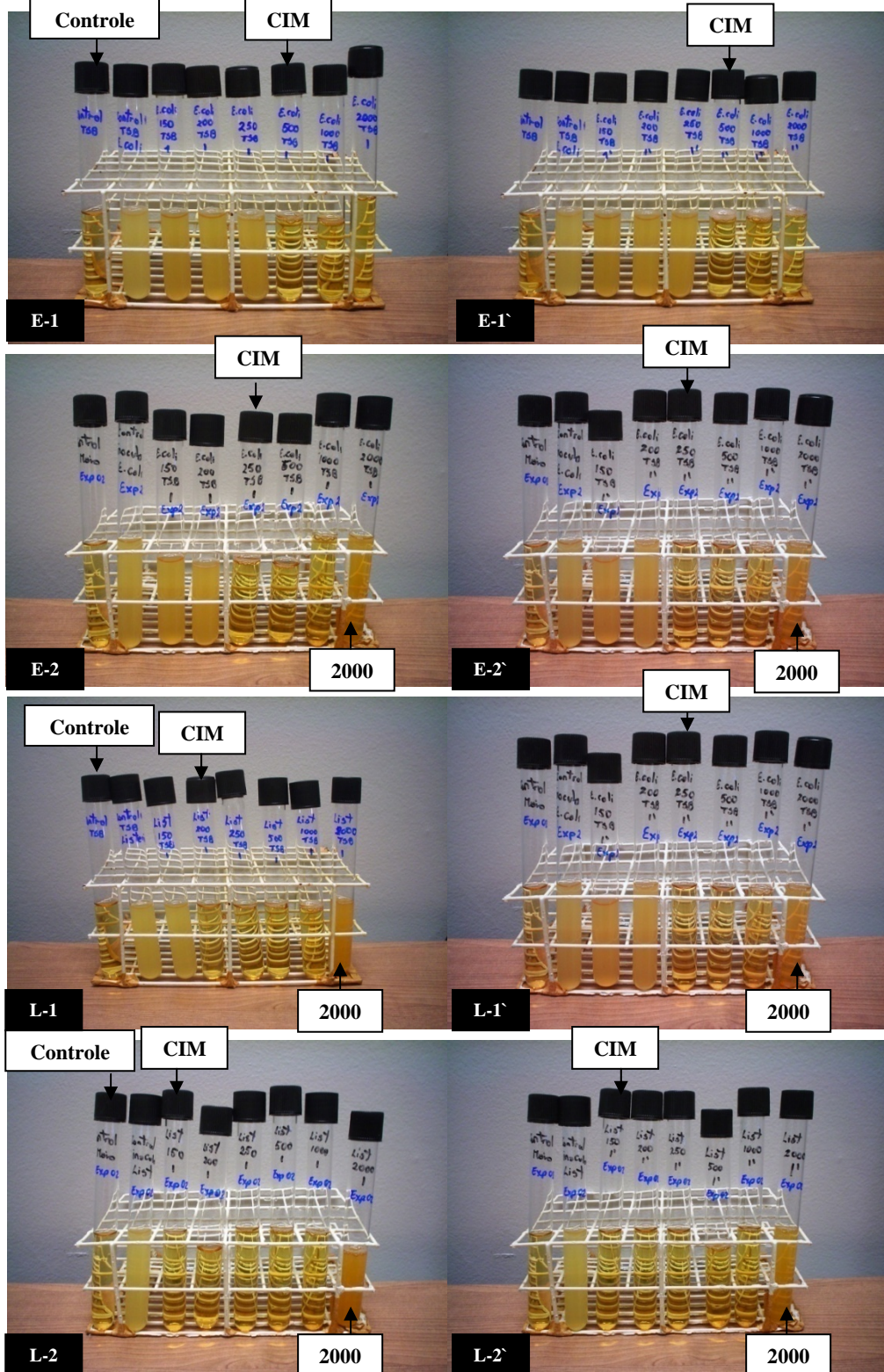
Na Figura 8, pode-se observar que a uma concentração de 2000 µg/ml de trans-cinamaldeído a turbidez formada foi de cor diferente do controle positivo, possivelmente porque nesta elevada concentração não existe uma boa solubilidade do antimicrobiano em caldo TSB. Kim, Marshall e Wei (1995, p. 2840) observaram que a partir de 1000 µg/ml a solubilidade do trans-cinamaldeído em caldo TSB é limitada ou diminuída. Este fato pode explicar, também, porque a concentração 2000 µg/ml em um resultado teve-se crescimento de *E. coli* (Tabela 6).

A maioria dos antimicrobianos são mais efetivos contra bactérias Gram-positivas do que contra bactérias Gram-negativas (BURT, 2004, p. 251; LEMOS *et al.*, 1990 *apud* KIM; MARSHALL; WEI, 1995, p. 2844, SMITH-PALMER; STEWART; FYFE 1998, p. 121). Contudo nesta pesquisa pode-se observar que a nível inibitório *Listeria innocua* (Gram-

⁴⁹ Sinônimo de trans-cinamaldeído (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES, 2004, p 14).

positiva) (200 µg/ml) foi mais sensível que *E. coli* (Gram-negativa) (500 µg/ml), mas quando se determinou a CBM as duas bactérias apresentaram os mesmos resultados (500 µg/ml).

Figura 8 - Resultados da CIM do trans-cinamaldeído contra *E. coli* e *L. innocua*



Fonte: Própria do autor (2012).

E-1, E-1', E-2, E-2': Resultados para *E. coli* na repetição 1 e 2 com suas respectivas duplicatas.

L-1, L-1', L-2, L-2': Resultados para *L. innocua* na repetição 1 e 2 com suas respectivas duplicatas.

4.3 INCIDÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* E *LISTERIA MONOCYTOGENES*

As boas praticas de produção aplicadas foram satisfatorias, não tendo sido detectada a presença de *Escherichia coli* e *L. monocytogenes* em 25g de melão minimamente processado.

4.4 EXPERIMENTO 1: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COBERTURAS DE QUITOSANA E DE QUITOSANA COM TRANS-CINAMALDEÍDO SOBRE A MICROBIOTA PRÓPRIA DO MELÃO MINIMAMENTE PROCESSADO

4.4.1 Bactérias aeróbias mesófilas

No melão minimamente processado e sem cobertura T1 (M) (controle), observa-se (Tabela 7) no tempo zero, uma contagem de 3,43 log₁₀ UFC/g de bactérias aeróbias mesófilas. Este resultado é similar aos reportados por Ruiz-Cruz *et al.* (2010, p. 4) de 3,9 log₁₀ UFC/g; Millán-Trujillo *et al.* (2001, p. 3) de 3,38 log₁₀ UFC/g em melão (*Cucumis melo* L.) “Cantaloupe”.

Tabela 7 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob as bactérias aeróbias mesófilas no melão minimamente processado armazenados a 4 °C durante 21 dias

Tratamento	Log ₁₀ UFC/g de Bactérias aeróbias mesófilas				
	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	3	7	14	21
T1 (M)	3,43 ± 0,34 ^{a*}	1,97 ± 0,34 ^{a*}	2,74 ± 0,39 ^{a*}	2,81 ± 0,09 ^{a*}	3,68 ± 0,22 ^{a*}
T2 (MQ)	1,16 ± 0,30 ^b	1,11 ± 0,22 ^b	1,14 ± 0,23 ^b	1,10 ± 0,19 ^b	1,28 ± 0,45 ^b
T3 (MQT)	1,11 ± 0,22 ^b	1,00 ± 0,00 ^b	1,20 ± 0,22 ^b	1,23 ± 0,26 ^b	1,55 ± 0,75 ^b

Fonte: Própria do autor (2012).

M: Melão minimamente processado.

MQ: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana.

MQT: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana e trans-cinamaldeído.

Os valores são a media de 4 determinações com suas respectivas duplicatas (n=8) ± desvio padrão.

* Os valores são a media de 2 determinações com suas respectivas duplicatas (n=4) ± desvio padrão.

Limite de detecção: 1 log₁₀ (UFC/g).

Os valores que estão na mesma coluna que são seguidas de pelo menos uma letra igual são significativamente iguais (P≤0,001).

Nos melões minimamente processados com cobertura de quitosana T2 (MQ) e com cobertura de quitosana com trans-cinamaldeído T3 (MQT), as contagens das bactérias aeróbias mesófilas foram reduzidas quando comparados ao controle, demonstrando-se, portanto, que estas apresentam uma ação positiva sobre a população de bactérias aeróbias mesófilas, mas não se observou diferença estatisticamente significativa ($P > 0,001$) entre as duas coberturas.

O Brasil não tem uma legislação específica para alimentos minimamente processados. Embora não tenha valor legal, pode ser feita uma comparação dos resultados obtidos nesta pesquisa com os de outros países para avaliação de qualidade. Os valores obtidos para bactérias mesófilas no tempo zero e 21 dias de armazenamento a 4 °C indicam a qualidade microbiológica dos melões e as boas práticas aplicadas durante o processamento, ao serem comparados com a legislação francesa que determina níveis máximos de 4 log₁₀ UFC/g (ERTURK; PICHA 2005, p. 371; IBRAHIM *et al.*, 2005, p. 24) e a espanhola que considera seguro para consumo os com valores máximos de 7 log₁₀ UFC/g para frutos minimamente processados (BART *et al.*, 2009, p. 163).

A redução inicial de bactérias aeróbias mesófilas conseguida com as coberturas comestíveis foi de 2,27 ciclos log₁₀ (66,2 %) para T2 (MQ)⁵⁰ e de 2,32 ciclos log₁₀ (67,6 %) para T3 (MQT)⁵¹ (Figura 9). Estes valores são superiores aos obtidos por Ruiz-Cruz *et al.* (2010, p. 1) com coberturas de quitosana⁵² [quitosana (1%) – amido (1%), quitosana (2,5%) – amido (0,5%) e com quitosana (1,5%)], verificando uma redução de 0,7 ciclos log₁₀; porém, são menores quando comparados as reduções obtidas por krasaekoopot e Mabumrung (2008, p. 554) com cobertura de metilcelulosa⁵³ (3% w/w) - glicerol (2% w/w) – quitosana⁵⁴ (1,5 e 2% w/w) constatando-se uma redução de 3-4 ciclos log₁₀.

Esta diferença de resultados pode ser explicada pelo tipo e concentração de quitosana utilizada na elaboração de cada cobertura. A atividade antimicrobiana da quitosana está associada ao seu peso molecular, tendo maior atividade a baixo peso molecular (UCHIDA, 1989 *apud* KRASAEKOOPOT; MABUMRUNG, 2008, p. 553; WANG *et al.*, 2011, p. 12413; ZHENG; ZHU, 2003, p. 529). Segundo krasaekoopot e Mabumrung (2008, p. 554, 556) à medida que se aumenta a concentração da quitosana seu efeito antimicrobiano é maior.

⁵⁰ 2 % de quitosana de médio peso molecular.

⁵¹ 2 % de quitosana de médio peso molecular e 0,05 % de Trans-cinamaldeído.

⁵² Tipo de quitosana não foi especificado.

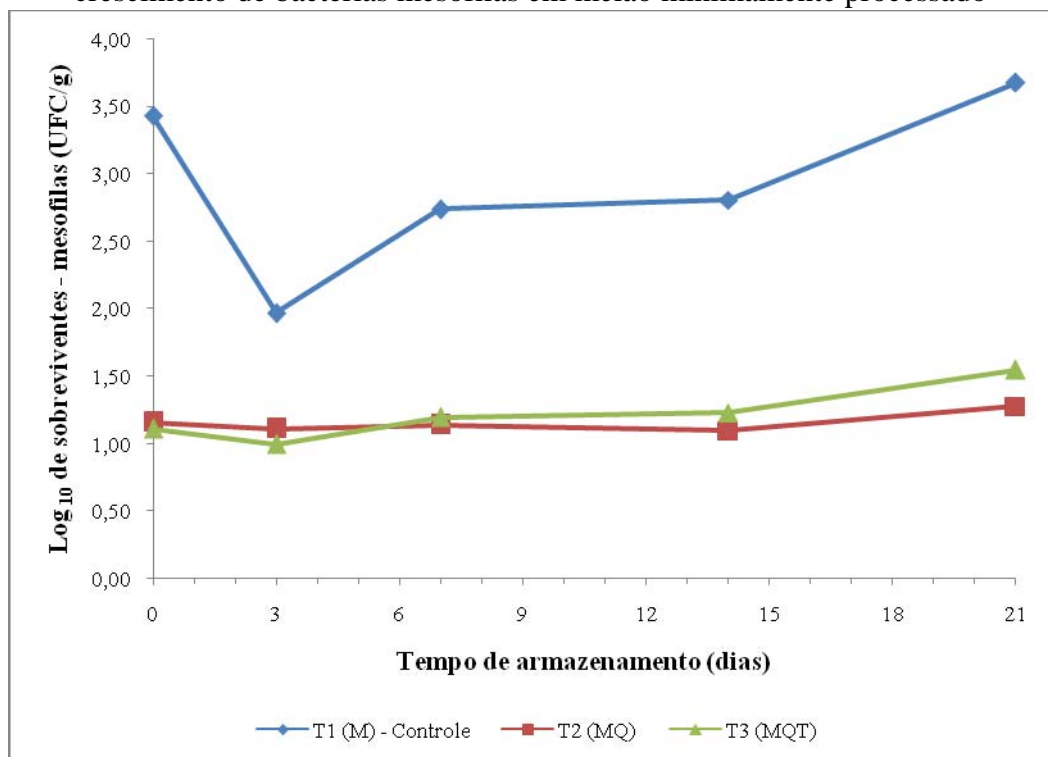
⁵³ A metilcelulosa não possui propriedades antimicrobianas (KRASAEKOOPOT; MABUMRUNG, 2008, p. 553).

⁵⁴ Quitosana de baixo peso molecular (*Id.*, 2008, p. 553).

Na Figura 9, verifica-se que as duas coberturas apresentam ação antimicrobiana durante o armazenamento do produto. O tratamento T3 (MQT) apresenta um aumento de bactérias aeróbias mesófilas de 0,44 ciclos \log_{10} quando comparada a T2 (MQ) que aumentou somente 0,12 ciclos \log_{10} no período de 0 a 21 dias, mostrando que possivelmente o trans-cinamaldeído diminuiu a atividade antimicrobiana na cobertura T3 (MQT).

Para os três tratamentos (T1, T2 e T3) pode ser observado (Figura 9), que durante o armazenamento refrigerado a 4 °C ocorreu uma redução da população de bactérias mesófilas aos 3 dias e aumento desta até os 21 dias, embora esses resultados não comprometessem a qualidade do produto final. Este comportamento pode ser atribuído ao período de adaptação (lag fase) das bactérias, quando são submetidas a tratamentos físicos ou químicos, ocorrendo após este período o início da fase log.

Figura 9 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob o crescimento de bactérias mesófilas em melão minimamente processado



Fonte: Própria do autor (2012).

M: Melão minimamente processado.

MQ: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana.

MQT: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana e trans-cinamaldeído.

Os valores são a média de 4 determinações com suas respectivas duplicatas (n=8) \pm desvio padrão.

Os valores para T1 (M) são a média de 2 determinações com suas respectivas duplicatas (n=4) \pm desvio padrão.

Limite de detecção: 1 \log_{10} (UFC/g).

A diminuição da microbiota própria do melão minimamente processado nas duas coberturas pode ser atribuída, principalmente, pela atmosfera ligeiramente anaeróbica que

pode ter sido gerada pela cobertura comestível aplicada ao melão minimamente processado (LÁRES-VELÁSQUEZ, 2008, p.7) e pela ação antimicrobiana da quitosana (GONZALES-AGUILAR *et al.*, 2005, p. 130).

4.4.2 Bactérias psicrófilas

A contagem inicial de bactérias psicrófilas (Tabela 8) para T1 (M) (controle) foi de $2,32 \log_{10}$ UFC/g e resultados similares foram reportados por Millán-Trujillo *et al.* (2001, p. 3) de $2,4 \log_{10}$ UFC/g. Nos tratamentos T2 e T3 os valores obtidos mostram que as duas coberturas apresentam ação antimicrobiana contra as bactérias psicrófilas já no início (tempo zero), mas não há diferenças estatísticas significativas ($P > 0,001$) entre as duas coberturas.

Tabela 8 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob as bactérias psicrófilas no melão minimamente processado armazenados a 4 °C durante 21 dias

Tratamento	Log ₁₀ UFC/g de Bactérias psicrófilas				
	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	3	7	14	21
T1 (M)	$2,32 \pm 0,68^{a*}$	$1,71 \pm 0,31^{a*}$	$2,44 \pm 0,90^{a*}$	$3,55 \pm 0,43^{a*}$	$6,16 \pm 0,29^{a*}$
T2 (MQ)	$1,14 \pm 0,19^b$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,11 \pm 0,30^b$	$1,32 \pm 0,60^b$	$1,31 \pm 0,46^b$
T3 (MQT)	$1,04 \pm 0,10^b$	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,19 \pm 0,36^b$	$1,71 \pm 1,18^b$	$1,75 \pm 0,83^b$

Fonte: Própria do autor (2012).

M: Melão minimamente processado.

MQ: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana.

MQT: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana e trans-cinamaldeído.

Os valores são a média de 4 determinações com suas respectivas duplicatas (n=8) \pm desvio padrão.

* Os valores são a média de 2 determinações com suas respectivas duplicatas (n=4) \pm desvio padrão.

Limite de detecção: $1 \log_{10}$ (UFC/g).

Os valores que estão na mesma coluna que são seguidas de pelo menos uma letra igual são significativamente iguais ($P \leq 0,001$).

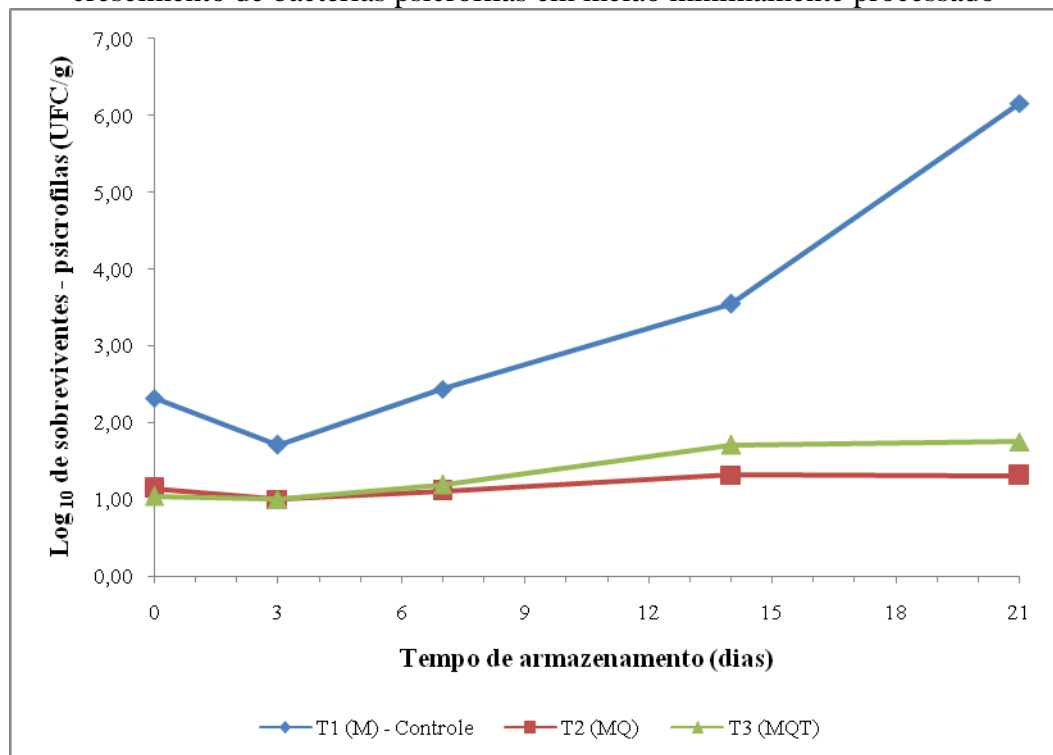
A redução inicial de bactérias psicrófilas com as coberturas comestíveis foi de 1,18 ciclos \log_{10} (50,9 %) para T2 (MQ) e de 1,28 ciclos \log_{10} (55,2 %) para T3 (MQT).

Durante os 21 dias de armazenamento observou-se (Tabela 8 e Figura 10), que ocorreu crescimento destas bactérias no controle T1 (M), chegando até $6,16 \log_{10}$ UFC/g o que não aconteceu nos melões com cobertura T2 (MQ) e T3 (MQT), que tiveram crescimentos que chegaram somente até $1,31 \log_{10}$ UFC/g e $1,75 \log_{10}$ UFC/g respectivamente. Apesar de não existir uma diferença estatisticamente significativa na ação antimicrobiana entre as duas coberturas, o T3 (MQT) apresentou um aumento de bactérias psicrófilas de 0,71 ciclos \log_{10} , quando comparado a T2 (MQ) que aumentou 0,17 ciclos \log_{10}

desde 0 até 21 dias, sugerindo que possivelmente o trans-cinamaldeído diminui a atividade antimicrobiana na cobertura T3 (MQT).

Krasaekoopt e Mabumrung (2008, p. 554) conseguiram reduzir as contagens de bactérias psicrófilas até o limite de detecção utilizado no seu experimento ($100 \text{ UFC/g} = 2 \log_{10} \text{ UFC/g}$) durante todo o tempo de armazenamento do melão minimamente processado, utilizando uma cobertura de metil celulosa (3%) - quitosana⁵⁵ (1,5 e 2%). Comparando esses resultados à presente pesquisa cujo limite de detecção do método é 10 UFC/g ($1 \log_{10} \text{ UFC/g}$), ressalta-se que é muito importante trabalhar com limites de detecção mais baixos, para realmente poder observar diferenças entre as coberturas aplicadas.

Figura 10 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob o crescimento de bactérias psicrófilas em melão minimamente processado



Fonte: Própria do autor (2012).

M: Melão minimamente processado.

MQ: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana.

MQT: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana e trans-cinamaldeído.

Os valores são a média de 4 determinações com suas respectivas duplicatas ($n=8$) \pm desvio padrão.

Os valores para T1 (M) são a média de 2 determinações com suas respectivas duplicatas ($n=4$) \pm desvio padrão.

Limite de detecção: $1 \log_{10} \text{ UFC/g}$.

Não há uma norma que regule a presença de bactérias psicrófilas em alimentos minimamente processados, embora estes sejam muito importantes nestes tipos de produto,

⁵⁵ Quitosana de baixo peso molecular (KRASAEKOOPT; MABUMRUNG, 2008, p. 553).

devido a sua capacidade de crescer à temperaturas de refrigeração, e porque algumas espécies são capazes de sintetizar enzimas pectolíticas que degradam a parede celular, ocasionando amolecimento nos tecidos e conseqüentemente a perda de textura.

Contagens de bactérias psicrófilas entre 10^6 e 10^7 UFC/g afetam a qualidade visual de produtos minimamente processados (BARRIGA *et al.*, 1991 *apud* BASTOS, 2004, p. 109). Com 21 dias de armazenamento (Tabela 8 e Figura 10) observa-se elevada contagem de bactérias psicrófilas para T1(M), contudo para T2 (MQ) e T3 (MQT) estas foram inferiores a $2 \log_{10}$ UFC/g.

4.4.3 Coliformes totais e *E. coli*

No tempo zero de armazenamento (Tabela 9), existem diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,001$) entre o controle T1 (M) e os tratamentos T2 (MQ) e T3 (MQT), que são os melões com coberturas, porém, não ha diferenças estatísticas significativas ($P > 0,001$) entre as duas coberturas. A contagem inicial de coliformes totais para o controle T1 (M) foi de $2,53 \log_{10}$ UFC/g. Valores praticamente iguais foram reportados por Ruiz-Cruz *et al.* (2010, p. 5).

Não se detectou a presença de *E. coli* durante todo o tempo de estudo, tanto em T1(M), T2 (MQ) e T3 (MQT), atendendo aos critérios microbiológicos do processo de higiene para frutas minimamente processadas, segundo a comissão reguladora da Europa (EC) N° 2073/2005, que estabelece valores de $2 \log$ UFC/g para *E. coli* (EUROPA, 2005, p. 27).

Tabela 9 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob coliformes totais no melão minimamente processado armazenados a 4 °C durante 21 dias

Tratamento	Log ₁₀ UFC/g de Coliformes totais				
	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	3	7	14	21
T1 (M)	$2,53 \pm 0,32^a$	$1,06 \pm 0,17^a$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^a$
T2 (MQ)	$1,00 \pm 0,00^b$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,00 \pm 0,00^a$
T3 (MQT)	$1,04 \pm 0,11^b$	$1,00 \pm 0,00^a$	$1,12 \pm 0,22^a$	$1,06 \pm 0,17^a$	$1,00 \pm 0,00^a$

Fonte: Própria do autor (2012).

M: Melão minimamente processado.

MQ: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana.

MQT: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana e trans-cinamaldeído.

Os valores são a média de 4 determinações com suas respectivas duplicatas (n=8) \pm desvio padrão.

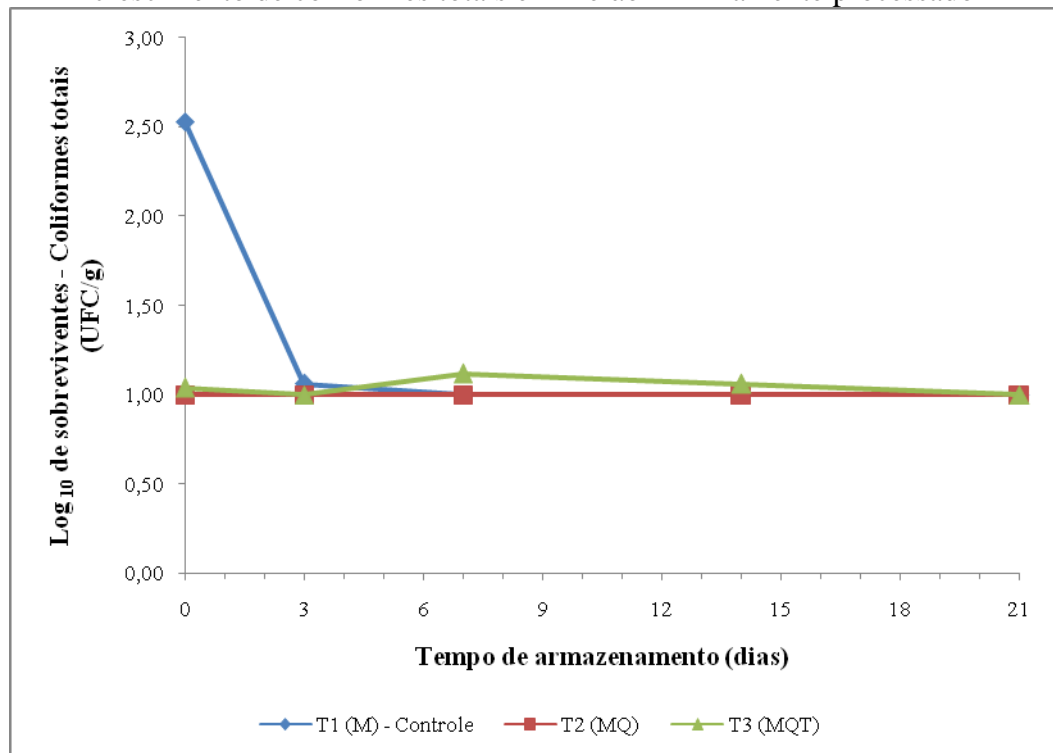
Limite de detecção: $1 \log_{10}$ (UFC/g).

Os valores que estão na mesma coluna que são seguidas de pelo menos uma letra igual são significativamente iguais ($P \leq 0,001$).

As reduções iniciais de coliformes totais, conseguidas ao aplicar as coberturas T2 (MQ) e T3 (MQT) foram 1,53 ciclos \log_{10} (60,5 %) e 1,49 ciclos \log_{10} (58,9 %), respectivamente (Figura 11).

Krasaekoopt e Mabumrung (2008, p. 556) reportaram que reduziram 3,8 ciclos \log_{10} quando aplicaram uma cobertura de metilcelulosa (3%) - quitosana⁵⁶ (1,5 e 2 %) em melão minimamente processado. Esta maior redução obtida por estes pesquisadores pode ser explicada pelo fato de que a contagem inicial de coliformes totais no seu controle foi de 4,8 \log_{10} UFC/g, e neste experimento a contagem inicial no controle foi de 2,53 \log_{10} UFC/g. Com a cobertura de quitosana a contagem obtida atingiu o limite de detecção que é 1 \log UFC/g.

Figura 11 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob o crescimento de coliformes totais em melão minimamente processado



Fonte: Própria do autor (2012).

M: Melão minimamente processado.

MQ: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana.

MQT: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana e trans-cinamaldeído.

Os valores são a média de 4 determinações com suas respectivas duplicatas (n=8) \pm desvio padrão.

Limite de detecção: 1 \log_{10} UFC/g.

Durante o armazenamento refrigerado para T1(M) ocorreu uma redução de 1,47 ciclos \log_{10} entre 0 e 3 dias, e a partir deste a população de coliformes totais atingiu 1 \log UFC/g até o final da estocagem, não ocorrendo diferença estatística ($P > 0,001$) entre o

⁵⁶ Quitosana de baixo peso molecular (KRASAEKOOPT; MABUMRUNG, 2008, p. 553).

controle e as duas coberturas (Tabela 9 e Figura 11). Estes valores diferem dos reportados por Ruiz-Cruz *et al.* (2010, p. 5), que no final de armazenamento refrigerado a 5 °C, os coliformes chegam a uma população de 1,9 log UFC/g nos melões minimamente processados com coberturas de quitosana⁵⁷ (1%) – amido (1%), quitosana (2,5%) – amido (0,5%) e com quitosana (1,5%).

Na Figura 11 observa-se que a o tratamento T3 (MQT) apresenta uma redução em sua ação antimicrobiana quando comparado a T2 (MQ), indicando que possivelmente o trans-cinamaldeído nas condições do experimento reduz a atividade antimicrobiana da quitosona.

4.4.4 Bolores e leveduras

A contagem inicial de bolores e leveduras no melão sem cobertura (controle) T1 (M) é de 1,50 log₁₀ UFC/g. Valores diferentes para melão minimamente processado foram reportados por Ruiz-Cruz *et al.* (2010, p. 6) de 0,6 log₁₀ UFC/g e por Millán-Trujillo *et al.* (2001, p. 3) na ordem de 3 log₁₀ UFC/g de leveduras.

Tabela 10 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob bolores e leveduras no melão minimamente processado armazenados a 4 °C durante 21 dias

Tratamento	Log ₁₀ UFC/g Bolores e leveduras				
	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	3	7	14	21
T1 (M)	1,50 ± 0,29 ^{a*}	1,20 ± 0,25 ^{a*}	1,24 ± 0,28 ^{a*}	3,40 ± 0,46 ^{a*}	6,13 ± 0,32 ^{a*}
T2 (MQ)	1,00 ± 0,00 ^b	1,00 ± 0,00 ^b	1,00 ± 0,00 ^b	1,18 ± 0,34 ^b	1,04 ± 0,11 ^b
T3 (MQT)	1,00 ± 0,00 ^b	1,00 ± 0,00 ^b	1,00 ± 0,00 ^b	1,00 ± 0,00 ^b	1,00 ± 0,00 ^b

Fonte: Própria do autor (2012).

M: Melão minimamente processado.

MQ: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana.

MQT: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana e trans-cinamaldeído.

Os valores são a média de 4 determinações com suas respectivas duplicatas (n=8) ± desvio padrão.

* Os valores são a média de 2 determinações com suas respectivas duplicatas (n=4) ± desvio padrão.

Limite de detecção: 1 log₁₀ (UFC/g).

Os valores que estão na mesma coluna que são seguidas de pelo menos uma letra igual são significativamente iguais (P≤0,001).

Para os melões com cobertura T2 (MQ) e T3 (MQT) o valor obtido foi 1,00 log₁₀ UFC/g. Ao analisar os resultados obtidos no tempo zero (Tabela 10), conclui-se que a ação

⁵⁷ Tipo de quitosana não foi especificado.

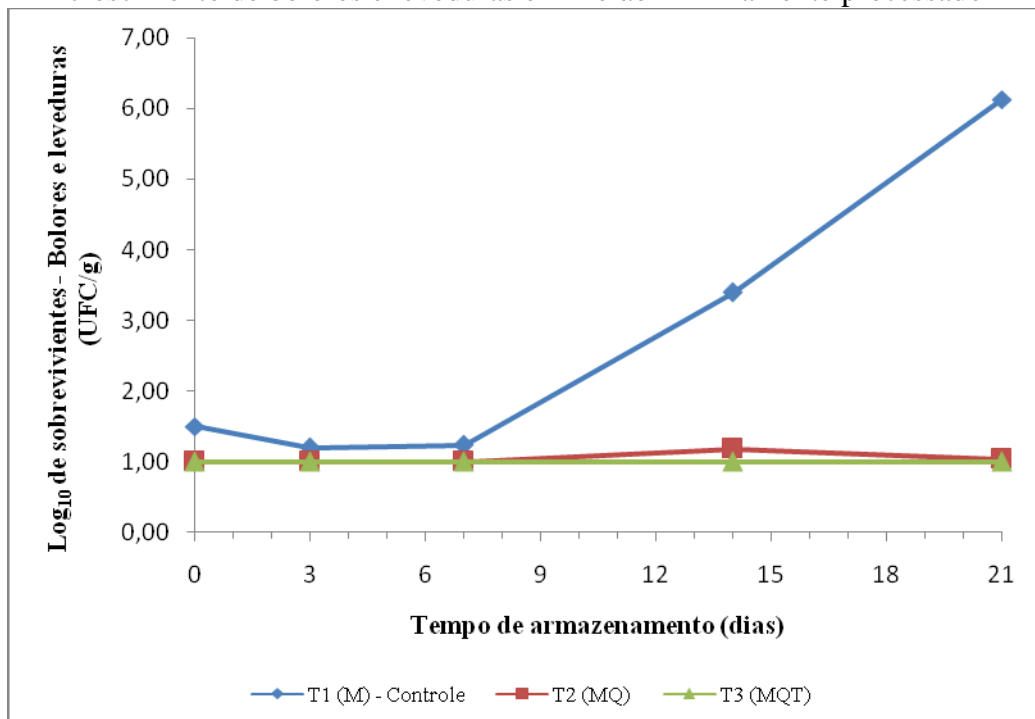
antimicrobiana das coberturas é significativa ($P \leq 0,001$) quando comparada ao controle, mas entre as duas coberturas não há diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,001$).

Segundo os critérios microbiológicos, as frutas sem tratamento térmico não devem exceder de 6 log UFC/g para leveduras (IFST, 1999 *apud* ROJAS-GRAU *et al.*, 2007b, p. 262); segundo a legislação espanhola o limite legal para leveduras é 5 log₁₀ UFC/g e o limite dos bolores é 3 log₁₀ UFC/g (BART *et al.*, 2009, p. 163). Nossos valores para T2 (MQ) e T3 (MQT) estão dentro destes limites durante todo o tempo de armazenamento.

A redução inicial de bolores e leveduras conseguida com as coberturas comestíveis atingiu o limite de detecção (1 log₁₀ UFC/g) do método empregado, correspondendo a 0,5 ciclos log₁₀ (33,3 %) tanto para T2 (MQ) como para T3 (MQT).

Os resultados obtidos mostram (Figura 12 e Tabela 10) que no controle T1 (M) os bolores e leveduras cresceram durante 21 dias até 6,13 log₁₀ UFC/g e no caso de T2 (MQ) se observa um aumento no tempo 14 para 0,18 log₁₀ UFC/g e em T3 (MQT) não se detectou crescimento durante todo o tempo de armazenamento.

Figura 12 - Efeito das coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob o crescimento de bolores e leveduras em melão minimamente processado



Fonte: Própria do autor (2012).

M: Melão minimamente processado.

MQ: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana.

MQT: Melão minimamente processado com cobertura de quitosana e trans-cinamaldeído.

Os valores são a média de 4 determinações com suas respectivas duplicatas (n=8) ± desvio padrão.

Os valores para T1 (M) são a média de 2 determinações com suas respectivas duplicatas (n=4) ± desvio padrão.

Limite de detecção 1 log₁₀ UFC/g.

Ruiz-Cruz *et al.* (2010, p. 7) obtiveram valores de $2 \log_{10}$ UFC/g no final do armazenamento dos melões minimamente processados recobertos com coberturas de quitosana⁵⁸ [quitosana (1%) – amido (1%), quitosana (2,5%) – amido (0,5%) e com quitosana (1,5%)], Krasaekoopot e Mabumrung (2008, p. 554) com uma cobertura de metil celulosa (3%) – quitosana⁵⁹ (1,5 e 2 %) conseguiram reduzir as contagens de bolores e leveduras até o limite de detecção do método utilizado ($2 \log_{10}$ UFC/g).

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais adicionados nas coberturas comestíveis é eficiente quando estes são adicionados nas coberturas de alginato para cobrir melões minimamente processados obtendo-se uma redução da população inicial como também inibição do crescimento de bolores e leveduras (RAYBAUDI-MASSILIA; MOSQUEDA-MELGAR; MARTIN-BELLOSO, 2008, p. 318). Rojas-Grau *et al.* (2007b, p. 262) observaram também que quando se adicionavam óleos essenciais a cobertura de purê de maçã-alginato se obtinha ação antimicrobiana sob bolores e leveduras.

Nesta pesquisa pode-se observar que a atividade antimicrobiana de T2 (MQ) e de T3 (MQT) é devida principalmente a quitosana e em menor grau ao trans-cinamaldeído, em função do aumento da atividade antimicrobiana observada na cobertura com o trans-cinamaldeído.

Dutta, Dutta e Tripathi (2004, p. 24), reportam que a quitosana tem ação fungistática, sendo este comportamento observado nos melões com cobertura de quitosana.

A quitosana inibe o crescimento micelial e a esporulação ou ambos estados de desenvolvimento dos fungos (RAMOS-GARCÍA *et al.*, 2010, p. 47). A inibição consiste na aderência da quitosana na membrana plasmática dos fungos devido às interações eletrostáticas entre as cargas positivas da quitosana e das cargas negativas dos fosfolipídios formadores da membrana (EL GHAOUTH *et al.*, 1992, p. 778), desta maneira a quitosana ocasiona uma filtração através da membrana até chegar ao citosol. Uma vez dentro desta, afeta o mecanismo homeostático, que consiste em regular a concentração de Ca^{2+} dentro da célula, ocasionando instabilidade até sua morte. Porém, nem todos os fungos apresentam a mesma sensibilidade a quitosana, decorrente da composição dos fosfolipídios da membrana e particularmente da natureza de suas cargas (PALMA-GUERRERO *et al.*, 2008, 2009, 2010, p. 547, 593, 2238).

Nos óleos essenciais, o principal modo de ação do cinamaldeído contra os fungos é a inibição celular (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

⁵⁸ Tipo de quitosana não foi especificado.

⁵⁹ Quitosana de baixo peso molecular (KRASAEKOOPT; MABUMRUNG, 2008, p. 553).

4.5 EXPERIMENTO 2: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COBERTURAS DE QUITOSANA E DE QUITOSANA COM TRANS-CINAMALDEÍDO NO MELÃO MINIMAMENTE PROCESSADO INOCULADO COM *E. coli* ATCC 25922TM

Na Tabela 11 e Figura 13 são apresentados os resultados do efeito das coberturas testadas nos melões inoculados com *E. coli*.

As coberturas de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído no melão minimamente processado inoculado com *E. coli* ATCC 25922TM tiveram efeito antimicrobiano estatisticamente significativo ($P \leq 0,001$) quando comparado ao controle T4 (MI_E), uma vez que no tempo zero (logo após a aplicação da cobertura), observou-se uma diminuição de 4,48 ciclos \log_{10} (75 %) para T5 (MI_EQ) e 4,34 ciclos \log_{10} (72,7 %) para T6 (MI_EQT). As diferenças encontradas entre estas coberturas não são estatisticamente significativas ($P > 0,001$), demonstrando que a adição de trans-cinamaldeído na cobertura de quitosana nas condições deste experimento não melhorou a atividade antimicrobiana.

Tabela 11 - Sobreviventes de *E. coli* em melão minimamente processado recobertos com cobertura de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído armazenados a 4 °C durante 21 dias

Tratamento	Log ₁₀ UFC/g de sobreviventes de <i>E. coli</i>				
	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	3	7	14	21
T4 (MI _E)	5,97 ± 0,10 ^a	5,76 ± 0,17 ^a	4,60 ± 0,41 ^a	4,51 ± 0,70 ^a	3,49 ± 0,65 ^a
T5 (MI _E Q)	1,49 ± 0,37 ^b	1,04 ± 0,11 ^b	1,00 ± 0,00 ^b	1,22 ± 0,35 ^b	1,46 ± 0,51 ^b
T6 (MI _E QT)	1,63 ± 0,33 ^b	1,31 ± 0,36 ^b	1,32 ± 0,37 ^b	1,37 ± 0,41 ^b	1,56 ± 0,66 ^b

Fonte: Própria do autor (2012).

MI_E: Melão minimamente processado inoculado com *E. coli*.

MI_EQ: Melão minimamente processado inoculado com *E. coli* e com cobertura de quitosana.

MI_EQT: Melão minimamente processado inoculado com *E. coli* e com cobertura de quitosana e trans-cinamaldeído.

Os valores são a média de 4 determinações com suas respectivas duplicatas (n=8) ± desvio padrão.

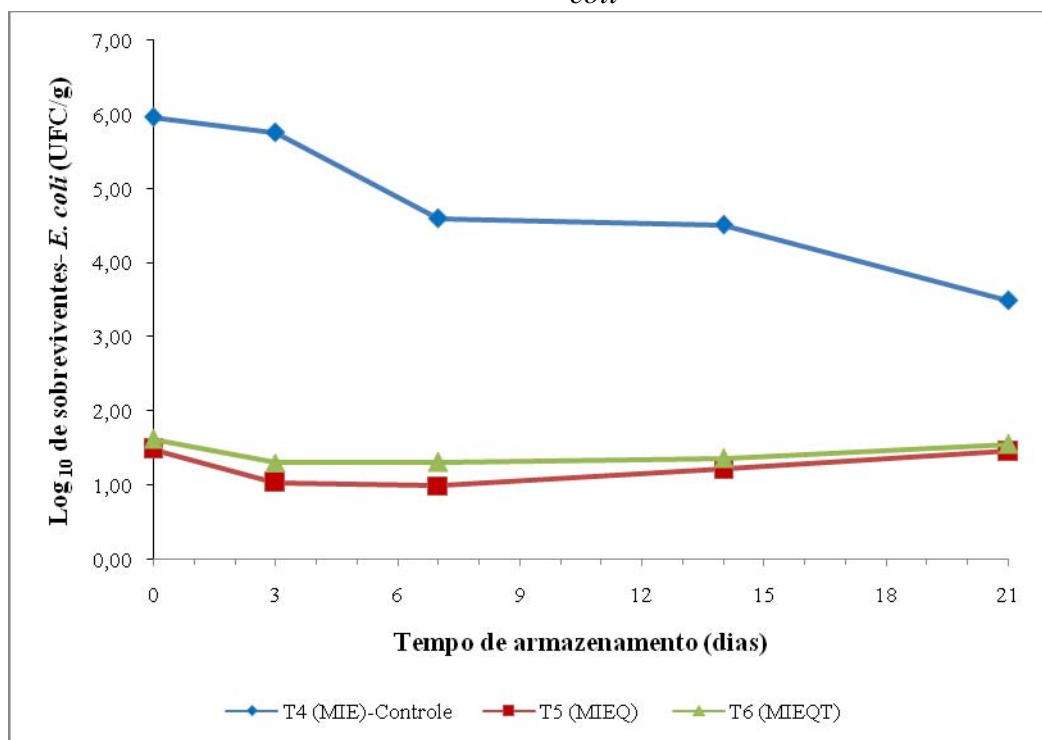
Limite de detecção: 1 \log_{10} (UFC/g).

Os valores que estão na mesma coluna que são seguidas de pelo menos uma letra igual são significativamente iguais ($P \leq 0,001$).

As reduções nas contagens iniciais de *E. coli* ATCC 25922TM no presente estudo podem ser atribuídos à ação antimicrobiana da quitosana e não às condições de anaerobioses, que poderiam ter sido geradas pela cobertura comestível de quitosana aplicada no melão minimamente processado, uma vez que *E. coli* é anaeróbica facultativa e o trans-cinamaldeído adicionado não mostrou nenhum efeito significativo.

No tratamento T4 (MI_E) (controle), observou-se que durante o armazenamento refrigerado (4 °C) do melão inoculado com *E. coli* ATCC 25922TM há uma diminuição da população de *E. coli* de 5,97 log₁₀ UFC/g (tempo zero) a 3,49 log₁₀ UFC/g (21 dias) (Tabela 11) correspondendo a 2,48 ciclos log₁₀. Raybaudi-Massilia (2007, p. 174) reportou uma diminuição de 2,77 ciclos log₁₀ em maçã minimamente processada inoculada com *E. coli* O157:H7 (CECT 4267)⁶⁰ durante os trinta dias de armazenamento refrigerado (5°C).

Figura 13 - Efeito da cobertura de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob o crescimento de *E. coli* em melão minimamente processado inoculado com *E. coli*



Fonte: Própria do autor (2012).

MI_E: Melão minimamente processado inoculado com *E. coli*.

MI_EQ: Melão minimamente processado inoculado com *E. coli* e com cobertura de quitosana.

MI_EQT: Melão minimamente processado inoculado com *E. coli* e com cobertura de quitosana e trans-cinamaldeído.

Os valores são a média de 4 determinações com suas respectivas duplicatas (n=8) ± desvio padrão.

Limite de detecção: 1 log₁₀ UFC/g.

Quando analisamos as contagens de *E. coli* durante o tempo de armazenamento refrigerado (4°C) no melão minimamente processado e inoculado com *E. coli* ATCC 25922TM para os tratamentos T5 (MI_EQ) e T6 (MI_EQT), observamos que existe uma diminuição da população de 0,03 ciclos log₁₀ para T5 (MI_EQ) que era inicialmente de 1,49 log₁₀ UFC/g e de 0,07 ciclos log₁₀ para T6 (MI_EQT), que inicialmente era de 1,63 log₁₀ UFC/g. Como no controle observou-se uma diminuição das contagens desta bactéria, as reduções nos

⁶⁰ Cepa de *Escherichia coli* da coleção espanhola de cultura tipo (RAYBAUDI-MASSILIA, 2007, p. 168).

tratamentos T5 (MI_EQ) e T6 (MI_EQT) podem ser atribuídas ao armazenamento refrigerado (4 °C) e a ação antimicrobiana das coberturas aplicadas.

Durante todo o tempo de armazenamento não existiu diferenças significativas (P>0,001) entre as duas coberturas, portanto, a adição de trans-cinamaldeído nas condições da presente pesquisa não melhorou a atividade antimicrobiana da cobertura base. Raybaudi-Masilia (2007, p. 173) reportou que ao adicionar o cinamaldeído⁶¹ (0,5% v/v) na cobertura de alginato – ácido malico para cobrir maçã minimamente processada inoculada com *E. coli*, encontrou maior efetividade antimicrobiana do que o controle utilizado⁶². Nesta pesquisa observou-se que a partir do terceiro dia de armazenamento não foi detectada *E. coli* durante os trinta dias de armazenamento, sendo o limite de detecção deste método de 2 log₁₀ UFC/g. Comparando os resultados obtidos no presente estudo com os de Raybaudi-Masilia (2007, p. 173) observa-se que durante todo o tempo de armazenamento os valores são menores do que 2 log₁₀ UFC/g (Figura 13) e superiores ao limite de detecção que foi 1 log₁₀ UFC/g. Em estudos com antimicrobianos é importante utilizar métodos que apresentem alto limiar de detecção das contagens, a fim de avaliar corretamente sua ação.

4.6 EXPERIMENTO 3: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS COBERTURAS DE QUITOSANA E DE QUITOSANA COM TRANS-CINAMALDEÍDO NO MELÃO MINIMAMENTE PROCESSADO INOCULADO COM *L. innocua* ATCC 33090

Nos melões minimamente processados inoculados com *L. innocua* ATCC 33090, e com cobertura de quitosana T8 (MI_LQ) pode ser observado no tempo zero (após aplicação da cobertura) (Tabela 12 e Figura 14) uma redução da população de *L. innocua* de 1,68 ciclos log₁₀ (31,6 %), e os com cobertura de quitosana com trans-cinamaldeído T9 (MI_LQT) uma redução de 1,86 ciclos log₁₀ (35 %), quando comparado ao controle T7 (MI_L). Estes valores não apresentam diferenças significativas (P>0,001) entre as coberturas utilizadas para este tempo. Estes resultados demonstram que a adição de trans-cinamaldeído na cobertura de quitosana nas condições deste experimento não melhora significativamente o efeito antimicrobiano.

⁶¹ Trans-cinamaldeído e sinônimo de Cinamaldeído (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES, 2004, p 14).

⁶² Maça minimamente processada somente com cobertura foi utilizado como controle (RAYBAUDI-MASILIA 2007, p. 173).

Tabela 12 - Sobreviventes de *L. innocua* em melão minimamente processado recobertos com cobertura de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído armazenados a 4 °C durante 21 dias

Tratamento	Log ₁₀ UFC/g de sobreviventes de <i>L. innocua</i>				
	Tempo de armazenamento (dias)				
	0	3	7	14	21
T7 (MI _L)	5,32 ± 0,19 ^a	5,77 ± 0,11 ^a	7,72 ± 1,00 ^a	8,42 ± 0,59 ^a	8,68 ± 0,43 ^a
T8 (MI _L Q)	3,64 ± 0,34 ^b	3,43 ± 0,28 ^b	3,59 ± 0,71 ^b	3,98 ± 1,25 ^b	4,99 ± 0,59 ^b
T9 (MI _L QT)	3,46 ± 0,21 ^b	3,46 ± 0,20 ^b	3,88 ± 1,60 ^b	3,98 ± 0,60 ^b	4,40 ± 1,03 ^b

Fonte: Própria do autor (2012).

MI_L: Melão minimamente processado inoculado com *L. innocua*.

MI_LQ: Melão minimamente processado inoculado com *L. innocua* e com cobertura de quitosana.

MI_LQT Melão minimamente processado inoculado com *L. innocua* e com cobertura de quitosana e trans-cinamaldeído.

Os valores são a média de 4 determinações com suas respectivas duplicatas (n=8) ± desvio padrão.

Limite de detecção: 1 log₁₀ (UFC/g).

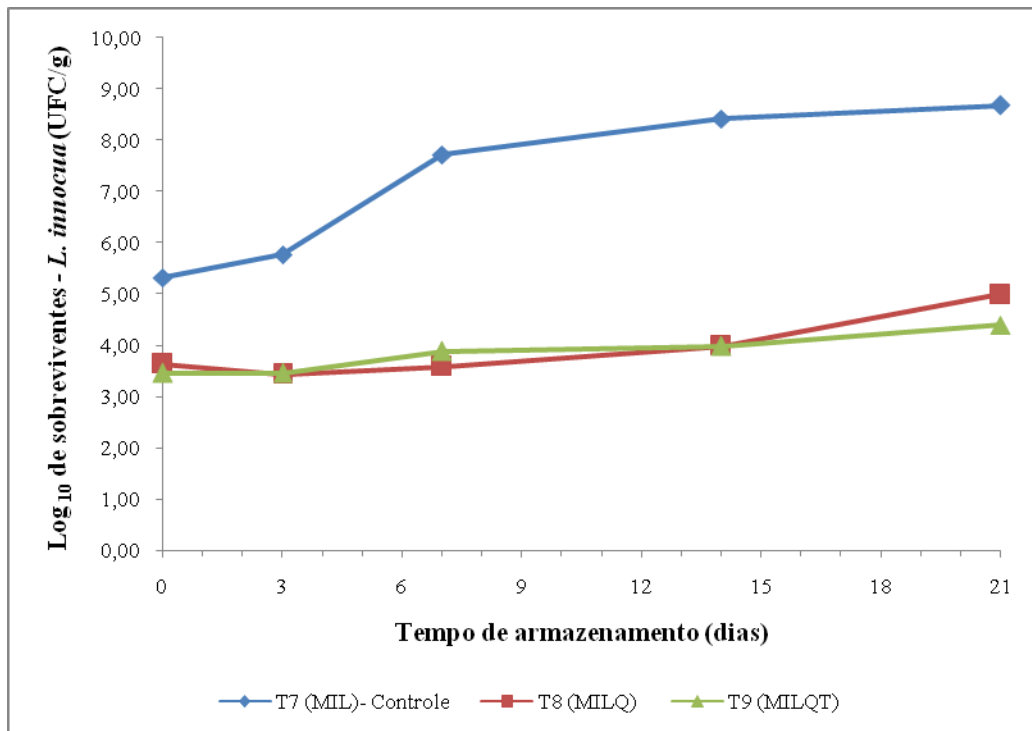
Os valores que estão na mesma coluna que são seguidas de pelo menos uma letra igual são significativamente iguais (P≤0,001).

Como a *L. innocua* é anaeróbica facultativa, as reduções nas contagens iniciais desta bactéria no presente estudo podem ser atribuídas à ação antimicrobiana da quitosana, e não às condições de anaerobioses que poderiam ter criado a cobertura comestível de quitosana aplicada no melão minimamente processado.

No melão minimamente processado inoculado com *L. innocua* ATCC 33090, T7 (MI_L) (controle), pode ser observado que durante o tempo de armazenamento a população de *L. innocua* aumenta de 5,32 log₁₀ UFC/g para 8,68 log₁₀ UFC/g, correspondendo a 3,36 ciclos log₁₀ até o dia 21. Estes dados constataam que *Listeria* pode crescer à temperatura de refrigeração (4 °C), porém resultados diferentes foram reportados por Raybaudi-Massilia *et al.* (2009b, p. 242) que observaram uma população constante de *L. monocytogenes* em maçãs minimamente processadas imersas em água (controle), armazenadas a 5 °C por 30 dias.

Os crescimentos de *L. innocua* durante o tempo de armazenamento nos tratamentos T8 (MI_LQ) e T9 (MI_LQT) foram de 1,35 ciclos log₁₀ e 0,94 ciclos log₁₀, respectivamente (Figura 14), evidenciando que as coberturas têm um efeito inibitório limitado, uma vez que esta consegue crescer; portanto sua ação é bacteriostática. O trans-cinamaldeído não apresentou melhoria significativa na ação inibitória sobre *L. innocua* durante o tempo de armazenamento.

Figura 14 - Efeito da cobertura de quitosana e quitosana com trans-cinamaldeído sob o crescimento de *L. innocua* em melão minimamente processado inoculado com *L. innocua*



Fonte: Própria do autor (2012).

MI_L: Melão minimamente processado inoculado com *L. innocua*.

MI_LQ: Melão minimamente processado inoculado com *L. innocua* e com cobertura de quitosana.

MI_LQT: Melão minimamente processado inoculado com *L. innocua* e com cobertura de quitosana com trans-cinamaldeído.

Os valores são a média de 4 determinações com suas respectivas duplicatas (n=8) ± desvio padrão.

Limite de detecção: <1 log₁₀ UFC/g.

A cobertura de quitosana apresentou menor efeito contra *L. innocua* (Gram-positiva) do que contra *E. coli* (Gram-negativa). Segundo Chung *et al.* (2004, p. 936) e Li, Feng e Yang (2010, p. 148), as bactérias gram-positivas mostram uma menor hidrofobicidade e também apresentam menores cargas negativas na superfície da célula, o que não favorece a uma boa interação com a quitosana e, por conseguinte tem uma menor atividade antimicrobiana contra elas.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A falta de sinergismo no efeito antimicrobiano entre a quitosana e o trans-cinamaldeído na cobertura testada pode ser atribuída a vários parâmetros:

- a natureza química do trans-cinamaldeído, uma vez que os óleos essenciais e seus compostos ativos contem uma ampla gama de substâncias voláteis, as quais poderiam dispersar-se na superfície dos frutos e afetar sua capacidade de inibir os microrganismos (HERNANDEZ-ALVARADO *et al.* 2011, p. 132; BAGÁN-TOMÁS 2009, p. 17);
- as interações da quitosana com trans-cinamaldeído, porque a quitosana pode reagir mediante pontes de hidrogênio com os terpenos dos óleos essenciais, afetando a atividade antimicrobiana das misturas (MAYACHIEW *et al.*, 2010, p. 129; HERNANDEZ-ALVARADO, 2011, p. 133);
- os dois antimicrobianos podem atuar direta ou indiretamente sobre a membrana plasmática provocando interações que reduzem a solubilidade do terpeno ativo (BASSOLÉ E JULIANI 2012, p. 3998);
- a quantidade de óleo essencial assim como a relação de óleo/polímero no filme ou cobertura, porque quando o polímero tem uma intensa atividade antimicrobiana (como a quitosana contra bactérias gram-negativas), a incorporação de óleo reduz esta atividade devido a redução efetiva da concentração disponível do polímero. Porém, a atividade antimicrobiana é reforçada quando o óleo essencial é mais ativo do que o polímero, tal como no caso dos filmes de carboidratos contra bactérias Gram positivas. Quando o polímero não tem atividade antimicrobiana, o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais geralmente incrementa-se com o aumento da relação óleo/polímero na cobertura base (SÁNCHEZ-GONZÁLES *et al.*, 2011, p. 1309);
- a temperatura utilizada, uma vez que à temperatura de 21 °C em amostra de água, o trans-cinamaldeído apresentou maior efeito antimicrobiano do que à baixas temperaturas (4 a 8 °C). Este comportamento é atribuído a diferença existente nos perfis de ácidos graxos e na fluidez da membrana bacteriana, ocasionando mudanças na membrana da célula bacteriana (que é o primeiro alvo para a atividade antimicrobiana do trans-cinamaldeído), podendo potencialmente interferir na ação antibacteriana deste composto (CHARLES *et al.*, 2008, p. 769; BASKARAN *et al.*, 2010, p. 128);
- ao método utilizado para o preparo da cobertura comestível com óleos essenciais ou seus compostos ativos, existindo na atualidade muitas variações e que apresentam diferentes resultados (XING *et al.*, 2011, p. 1444, 1446; OJAGH *et al.*, 2010a, p. 162, 164; OJAGH *et al.*, 2010b, p. 193; WANG *et al.*, 2011, p. 12412).

6 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos na determinação da CIM e CBM para o trans-cinamaldeído contra *Escherichia coli* (ATCC 25922TM) e *Listeria innocua* (ATCC 33090) sugerem uma ação bactericida e bacteriostático, respectivamente.
- A cobertura de quitosana (2%) e quitosana (2%) com trans-cinamaldeído (0,05%) apresentaram atividade antimicrobiana sobre a microbiota própria do melão, não ocorrendo diferença estatística significativa entre ambas.
- A cobertura de quitosana com trans-cinamaldeído quando comparada a de quitosana apresentou menor atividade antimicrobiana frente às bactérias mesófilas, psicrófilas e coliformes, entretanto maior ação contra bolores e leveduras, apesar de não ser significativo estatisticamente.
- As duas coberturas empregadas no melão mostraram exercer atividade antimicrobiana sobre *Escherichia coli* (ATCC 25922TM) e *Listeria innocua* (ATCC 33090), não eliminando totalmente a quantidade de bactérias e não sendo estatisticamente diferentes entre si.
- A cobertura elaborada com 2% de quitosana de médio peso molecular apresentou maior ação antimicrobiana contra *Escherichia coli* (ATCC 25922TM) (Gram -) do que contra *Listeria innocua* (ATCC 33090) (Gram +).
- A adição de trans-cinamaldeído (0,05%) na cobertura de quitosana (2%) não apresentou maior eficiência da ação antimicrobiana com relação aos microrganismos avaliados.

REFERÊNCIAS

- ALEGRE, I. *et al.* Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria innocua* on minimally-processed peaches under different storage conditions. **Food Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 862-868, 2010.
- ALMEIDA, A. S. *et al.* Conservação de melão Cantaloupe “acclaim” submetido à aplicação pós-colheita de 1-MCP. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 1-5, 2001.
- ALZAMORA, S. M.; TAPIA, M. S.; LOPEZ-MALO, A. **Processed fruits and vegetables: Fundamental aspects and Applications**. 1 ed. Maryland: Kluwer Academic. 2000. p. 361.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington, 2001.
- AVILA, A.J. *et al.* Películas de quitosana com sorbato de potássio unido física y covalentemente. Estudios de aplicación. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 11, n. 2, p. 73-87, 2010.
- AVILA-SOSA, R.; LOPEZ-MALO, A. Aplicação de substâncias antimicrobianas a películas y recubrimientos comestibles. **Temas selectos de Ingeniería de Alimentos**. Puebla, v. 2, n. 2, p. 4-13, ago-dic 2008. Disponível em: <<http://es.scribd.com/doc/69243247/Revista-Tsia-Vol-2-2>>. Acesso em: 29 mar. 2011.
- BAGÁN-TOMÁS, M. M. **Recubrimientos antimicrobianos a base de hidroxipropilmetilcelulosa y aceite esencial de árbol de te**. 2009. 20 f. Dissertação (Maestría em Gestión e seguridad alimentaria) - Universidad Politecnica de Valencia, España, 2009. Disponível em: <riunet.upv.es/handle/10251/14426>. Acesso em: 26 mar. 2012.
- BAI, R.-K.; HUANG, M.-Y.; JIANG, Y.-Y. Selective permeabilities of chitosan-acetic acid complex membrane and chitosan-polymer complex membranes for oxygen and carbon dioxide. **Polimer Bulletin**, v. 20, p. 83-88, 1988.
- BALDWIN, E. A. Surface treatments and edible coatings in food preservation. *In*: SHAFIUR-RAHMAN, M.; DEKKER, M. (Ed.) **Handbook of food preservation**. 2. ed. New York, U.S.A.: CRC Press, 1999. cap. 21, p. 477-508.
- BART, M. *et al.* Microbial spoilage of fruits and vegetables. SPERBER, W. H.; DOYLE, M. P. (Eds.) **Compendium of the Microbiological Spoilage of foods and Beverages, food microbiology and food safety**. Local: editora, 2009. p. 135-183.
- BASKARAN, S. A. *et al.* Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Apple juice and Apple cider by trans-cinamaldehyde. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 126-129, 2010.
- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, p. 3989-4006, 2012.

BASTOS, M. do S. R. **Frutas minimamente processadas: aspectos de qualidade e segurança.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 59 p. (Documentos, 103).

BASTOS, M. do S. R. **Processamento mínimo de melão Cantaloupe “Hy-Mark”: Qualidade e segurança.** 2004. 155 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2004.

BAUTISTA-BAÑOS, S. *et al.* Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, v. 22, n. 9, p. 1087-1092, 2003.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; BRAVO-LUNA, L. Evaluación del quitosano en el desarrollo de la pudrición blanda del tomate durante el almacenamiento. **Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha**, México, v. 6, n. 1, p. 63-67, 2004.

BELFIORE, M. *et al.* Guidelines for the production of fresh-cut fruit, *In: ISHS INTERNATIONAL CONFERENCE ON QUALITY MANAGEMENT OF FRESH-CUT PRODUCE: Convenience food for a tasteful life*, 2., 2011, Torino. **Book of abstracts.** Torino: [s. n.], 2011. p. 141. Disponível em: <http://www.freshcut2011.org/downloads/Freshcut2011_Book_of_Abstracts.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2012.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. ***E. coli*: Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos.** 1. ed. España: Acribia, S.A., 1998. 234 p.

BEVERLYA, R. L. *et al.* Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 534-537, 2008.

BOWLES, B. L.; MILLER, A. J. Antibotulinal properties os selected aromatic and aliphatic aldehydes. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 9, p. 788-794, 1993.

BOWLES, B. L.; SACKITEY, S. K.; WILLIAMS, A. C. Inhibitory effects off flavor compounds on Staphylococcus aureus WRRC B124. **Journal of Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 337-347, 1995.

BRAGA SOBRINHO, R. *et al.* **Produção integrada de melão.** 1. ed. Fortaleza: Embrapa Agroindustria Tropical, Banco do Nordeste do Brasil, 2008. 336 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 8 fev. 2012.

BURT, S. A. Essential oils: their antibacterial properties and applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CAGGIA, C. *et al.* Growth of acid-adapted *Listeria monocytogenes* in Orange juice and in minimally processed Orange slices. **Food Control**, v. 20, n. 1, p. 59-66, 2009.

CAMPANIELLO, D. *et al.* Chitosan: Antimicrobial activity and potential applications for preserving minimally processed strawberries. **Food Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 992-1000, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen Farms, Colorado**. Atlanta, 2011.

December 8, 2011 (FINAL update). Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>>. Acesso em: 2 jan. 2012.

CHANG, S. T.; CHEN, P. F.; CHANG, S. C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 123-127, 2001.

CHARLES, A. S. *et al.* Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in Cattle Drinking-Water by trans-cinnamaldehyde. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, n. 6, p. 763-771, 2008.

CHRYSSOGELOS, A. Fresh-cut fruit trends and opportunities in the United States. *In*: FRESH-CUT EUROPE, 2006, London UK, 2006. **Presentations**. London UK, 2006.

Disponível em:

<http://www.freshcuteurope.com/downloads/presentations/andrew_chryssogelos.pdf>.

Acesso em: 10 fev. 2012.

CHUNG, Y. C. *et al.* Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. **Acta Pharmacol Sin**, v. 25, n. 7, p. 932-936, 2004. Disponível em: <[http://www.ChinaPhar.com.Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall](http://www.ChinaPhar.com.Relationship%20between%20antibacterial%20activity%20of%20chitosan%20and%20surface%20characteristics%20of%20cell%20wall)>. Acesso em: 12 abr. 2012.

COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS. **CL 2011/1 – FH**. Roma, 2011. Assunto: Petición de datos sobre la identificación y el control de peligros microbiológicos asociados a los melones. Disponível em:

<ftp://ftp.fao.org/codex/Circular_Letters/CXCL2011/cl11_01s.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2011.

CORBO, M. R. *et al.* Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-sliced cactus-pear fruit. **Journal of Food Safety**, v. 25, n. 3, p. 157-172, 2005.

CORBO, M. R. *et al.* Fresh-cut preservation: current status and emerging Technologies. *In*: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Spain: Formatex, 2010. p. 1143-1154.

Disponível em: <<http://www.formatex.info/microbiology2/isbn2-contents.pdf>>. Acesso em: 26 mar. 2011.

DELAQUIS, P. J. *et al.* Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 101-109, 25 mar. 2002.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 703-714, 2004.

- DIAB, T. *et al.* Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruit preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 10, p. 988-1000, 2001.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.
- DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: Fundamentals and frontiers**. 2. ed. Washington, 2001. 872 p.
- DUSAN, F. *et al.* Essential oils- Their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 8, p. 1435-1445, 2006.
- DUTTA, P. K. *et al.* Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. Review. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1173-1182, 2009.
- DUTTA, P. K.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V.S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. **Journal of Science & Industrial Research**, v. 93, n. 1, p. 20-31, Jan. 2004.
- EL GHAOUTH, A. *et al.* Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. **Mycological Research**, v. 96, n. 9, p. 769-779, 1992.
- ERTURK, E.; PICHA, D. H. Microbiological quality of fresh-cut sweet potatoes. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 41, n. 4, p. 366-374, 2006.
- EUROPA. Commission regulation (EC) N° 2073/2005. Microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, p. 1-29, 2005. Disponível em: <<http://www.freshquality.org/files/Microbiological%20criteria.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2012.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Draft guidance *Listeria monocytogenes*. Compliance Policy Guide Sec. 555.320**. 2008. Last updated: 5 ju. 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm136694.htm>>. Acesso em: 15 out. 2012.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Agency Response letter GRAS Notice N° GRN 000170**. 2005. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm154586.htm>>. Acesso em: 1 mar 2012.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh-cut produce**. 2001. Last updated: 5 ju. 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm090977.htm>>. Acesso em: 11 mar. 2012.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food additives for direct addition to food for human consumption**. Subpart C. Coatings, films and related substances CFR-Code of federal

regulations title 21, v. 3. Cite: 21CFR172. [200-?a]. Last updated: 4 ene 2012. Disponível em: <<http://www.law.cornell.edu/cfr/text/21/172/subpart-C>>. Acesso em: 11 mar. 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CFR-Code of federal regulations title 21, v. 3. Cite: 21CFR182.60. [200-?b]. Revised: 1 abr 2011. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=182.60>>. Acesso em: 1 mar 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural toxins handbook *Escherichia coli* O157:H7**. United States, [200-?c]. Page Last Updated: 07/10/2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm071284.htm>>. Acesso em: 4 fev. 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Foodborne pathogenic microorganisms and natural Toxins handbook *Listeria monocytogenes***. United States, [200-?d]. Page Last Updated: 18/06/2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070064.htm>>. Acesso em: 4 fev. 2012.

FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campulobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella entérica*. **Journal of Food Protection**, v. 65, n, 10, p. 1545-1560, 2002.

FRIEDMAN, M.; KOZUKUE, N.; HARDEN, L. A. Cinnamaldehyde Content in foods Determined by gás chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5702-5709, 2000.

GARCIA, P. J. C. *et al.* Efecto del cultivar y distancia entre plantas sobre características fisicoquímicas del fruto del melón (*Cucumis melo* L.). **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 26, n. 2, p. 141-158, Caracas, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.org.ve/pdf/rfaz/v26n2/art01.pdf>>. Acesso em: 30 mar. 2012.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogones* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 1-9, 2006.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Mechanisms of bactericidal action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5750-5755, 2004.

GONZALES-AGUILAR, G. A. *et al.* Cubiertas comestibles de quitosano. Uma alternativa para prevenir el deterioro microbiano y conservar la calidad de papaya fresca cortada. *In*: SIMPOSIUM “NUEVAS TECNOLOGIAS DE CONSERVACION Y ENVASADO DE FRUTAS Y HORTALIZAS, VEGETALES FRESCOS CORTADOS”, Mar. 2005, La Habana, Cuba, 2005, p. 121-133. Disponível em:

<http://www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/fotos/files_pdf/cuba/gustavo.pdf>. Acesso em: 21 maio 2012.

GONZALES-AGUILAR, G. *et al.* Estado actual del mercado de frutos y vegetales frescos cortados. *In: SIMPOSIUM ESTADO ACTUAL DEL MERCADO DE FRUTOS Y VEGETALES CORTADOS EM IBEROAMERICA*, Abr. 2004, Costa Ric, 2004. p. 7-16. Disponível em: <http://www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/images/files_pdf/gustavo2.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2012.

GOY, R. C.; BRITTO, D. de; ASSIS, O. B. G. A Review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.

GROSSO, C. *et al.* Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. *Food Chemistry*, v. 111, n. 1, p. 197-203, 2008.

HAMMER, K. A.; CARSON C. F.; RILEY, T. V. Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of melaleuca alternifolia (tea tree oil). *American Journal of Infection Control*, v. 24, n. 3, p. 186-189, June 1996.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, v. 6, n. 6, p. 985-990, jun. 1999.

HAN, J. **Antimicrobial Packaging system for optimization of electron beam irradiation of fresh produce**. 2006. 158 f. Tese (Doctor of Philosophy) - Food Science and Technology, A&M University, Texas, 2006.

HEALTH CANADA, **Listeria Monocytogenes Challenge Testing of Ready-to-Eat refrigerated foods**. v. 1, 2010. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/pdf/legislation/pol/listeria-monocytogenes-eng.pdf>. Acesso em: 2 ago. 2011.

HEALTH PROTECTION BRANCH. (MFHPB-30). **Isolation of listeria monocytogenes from all food and environmental samples**. Ottawa, 2001.

HEALTH PROTECTION BRANCH. (MFLP-74). **Enumeration of Listeria monocytogenes in foods**. Ottawa, 2001.

HELANDER, I. M. *et al.* Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal Food Microbiology*, v. 71, n. 2-3, p. 235-244, 2001.

HERNÁNDEZ-ALVARADO, A. M. **Efecto antifúngico in vitro e in situ del quitosano y de aceites esenciales sobre Rhizopus stolonifer (Ehrenb.: FR.) Vuill.** 2009. 111f. Disertação (Maestria em Ciências em Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades) - Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, Morelos, 2009. Disponível em: <www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/.../28214>. Acesso em: 7 oct 2011.

HERNANDEZ-ALVARADO, A. M. *et al.* Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre Rhyzopus stolonifer (Ehrenb.:FR.) vuill., agente causal de la pudricion blanda del tomate. *Revista Colombiana de Biotecnología*. v. XIII, n. 2, p. 127-134, 2011.

HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N. *et al.* Potencial del quitosano en el control de las enfermedades postcosecha. **Revista Mexicana de fitopatología**, A.C. Ciudad de Obregón, Mexico, v. 23, n. 2, p. 198-205, 2005.

HOSSEINE, M. H. *et al.* Improving antibacterial activity of edible films based on chitosan by incorporating thyme and clove essential oils and EDTA. **Journal of Applied Sciences**, v. 8, n. 16, p. 2895-2900, 2008.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontier in Microbiology**, v. 3, n. 12, 2012.

IBRAHIM, R. *et al.* Effect of several packaging films on biochemical characteristics and microbiological counts shredded cabbage at different storage conditions. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 3, n. 2, p. 20-27, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ . **Metodos físico-químicos para análise de alimentos**. 6. ed. São Paulo, 2008. 1020 p.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Tradução de Eduardo Cesar Tondo *et al.* 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 710 p. Tradução de: Modern food microbiology.

JE, J.-Y.; KIM, S.-K. Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 18, p. 6629-6633, 2006.

JENNYLYND, B. J.; TIPVANNA, N. Processing of fresh-cut tropical fruits and vegetables: A technical guide. FAO, v. 16, p. 86, 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/014/i1909e/i1909e00.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

JENSON, I. *et al.*, *Listeria monocytogenes* in Australian ready-to-eat meats: risks and controls. **Food Australia**, v. 61, n. 6, p. 240-245, 2009.

JEON, Y. J.; PARK, P. J.; KIM, S. K. Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by bioreactor. **Carbohydrate Polimers**, 44, n. 1, p. 71-76, 2001.

JIA, P. *et al.* Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and sarA expression by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 409-416. 8 aug. 2011.

JIANG, L. **Coparison of disk diffusion, Agar dilution, and broth microdilution for antimicrobial susceptibility testing of Five chitosans**. 2011. 58f. Thesis (Master of Science) - Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and mechanical college, China 2011. Disponível em: <[td.lsu.edu/docs/available/etd-06072011-103035/unrestricted/\(Jiang\)thesis.pdf](http://td.lsu.edu/docs/available/etd-06072011-103035/unrestricted/(Jiang)thesis.pdf)>. Acesso em: 06 jul. 2012.

JIANG, Z.; NEETOO, H.; CHEN, H. Control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using chitosan-based antimicrobial coatings and films. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 22-26, 2011.

- KARAPINAR, M.; AKTUG, S. E. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. **International Journal of Food Microbiology**. v. 4, n. 2, p. 161-166, 1987.
- KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Influence of thermal process on structure and functional properties of emulsion-based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 5-6, p. 879-888, 2007.
- KIM, H. O.; PARK, S. W.; PARK, H. D. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomun cassia* shoot. **Food Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 105-110, 2004.
- KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. Antibacterial Activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry Florida**, v. 43, n. 11, p. 2839-2845, 1995.
- KRASAEKOOPT, W.; MABUMRUNG, J. Microbiological evaluation of edible coated fresh-cut Cantaloupe. **Kasetsart Journal "Natural Science"**. v. 42, n. 3, p. 552-557, 2008.
- LAMBERT, R, J, W. *et al.* A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.
- LAMIKANRA, O. **Fresh-cut Fruits and Vegetables. Science, Technology and Market.** CRC Press, Washington, D.C. 2002. 452 p.
- LAMINKANRA, O. *et al.* Biochemical and microbial changes during the storage of minimally processed cantaloupe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 5955-5961, 2000.
- LÁRES-VELÁSQUEZ, C. L. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en latinoamerica. **Revista UDO Agrícola**, Venezuela, v. 8, n. 1, p. 1-22, 2008. Disponível em: <<http://www.bioline.org.br/pdf?cg08002>>. Acesso em: 31 ago. 2011.
- LI, H.; YU, T. Effect of chitosan on incidence of Brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 2, p. 269-274, 2000.
- LI, X.-F.; FENG, X.-Q.; YANG, S. A mechanism of antimicrobial activity of chitosan against Gram-negative bacteria. **Food Science**, v. 31, n. 13, p. 148-153, 2010.
- LIN, D.; ZHAO, Y. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 6, n. 3, p. 60-75, 2007.
- LOPEZ-MATA, M. A. *et al.* Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano en la reducción microbiana y conservación de la calidad de fresas. **Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud**, Universidad Sonora, v. XIV, n. 1, p. 33-43, 2012.

LOPEZ-VÁZQUEZ, R. Investigación y desarrollo em el sector de frutas y hortalizas (IV gama). In: III JORNADAS DE INNOVACIÓN Y TECNOLOGIA ALIMENTARIA, 21 abr. 2010, La Rioja, 2010. p. 32. Disponível em: <http://www.ctic-larioja.es/documentos/file/i_d_sector_hortofruticola_rafael_lopez.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2012.

MACHADO, F. L. de C.; ALVES, R. E.; FIGUEIREDO, R. W. Application of 1-methylcyclopropene, calcium chloride and calcium amino acid chelate on fresh-cut cantaloupe muskmelon. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, n. 5, Brasília, p. 569-574, 2008.

MAYACHIEW, P. *et al.* Effects of drying methods and conditions on antimicrobial activity of edible chitosan films enriched with galangal extract. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 125-132, 2010.

MILLÁN-TRUJILLO, F. R. *et al.* Estudio de la estabilidad microbiológica del melón (*Cucumis melo* L) minimamente processado por impregnación al vacío. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion- ALAN**, v. 51, n. 2, p. 173-179, 2001.

MIRANDA, S. P. *et al.* Comportamiento de películas de quitosán compuesto en um modelo de almacenamiento de aguacate. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 47, n. 4, p. 331-336, 2003. Disponível em: <<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/475/47547408.pdf>>. Acesso em: 16 mar. 2012.

MOLTÓ, A. F. Curso internacional celebrado em Almería sobre a calidad e innovación en los productos minimamente procesados: Situación actual del procesado de frutas y hortalizas em IV gama. **Poscosecha**, seccion: Horticultura Global, n. 288. p. 10-15, fev. 2010. Disponível em: <http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rhg288/10_15.pdf>. Acesso em: 8 dic. 2011.

MUZZARELLI, R. *et al.* Antimicrobial properties of N-Carboxybutyl chitosan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 10, p. 2019-2023, 1990.

NAMESNY, A. Variedades de melón de larga vida comercial: 1 Melon Meeting, primer encuentro del melón organizado por Syngenta em Torrepacheco, Murcia, 2003. **Horticultura Internacional**, v. 42, p. 30-36, Nov. 2003.

NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS (NACMCF). Parameters for Determining inoculated pack/challenge study protocols, **Journal of food Protection**, v. 73, n 1, p. 140-202, 2010. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/pdf/nacmcf_jfp_inoculated_pack.pdf>. Acesso em: 9 ago. 2011.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY SCIENCE (NCCLS). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003. Disponível em: <http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/biblioteca/clsi_OPASM7_A6.pdf>. Acesso em: 3 mai. 2011.

NAVARRO-TARAZAGA, M. LL. **Efecto de la composición de recubrimientos comestibles a base de hidroxipropilmetilcelulosa y cera de abeja en la calidad de ciruelas, naranjas y mandarinas.** 2007. 208 f. Tese (Doctor em Tecnologia de Alimentos) - Universidad Politecnica de Valencia, Valencia, 2007. Disponível em: <<http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/1923/tesisUPV2699.pdf>>. Acesso em: 21 sep. 2011.

NO, H. K. *et al.* Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 65-72, 2002.

NO, H. K. *et al.* Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. **Journal of Food Science**, v.72, n. 5, p. 87-100, 2007.

OJAGH, S. M. *et al.* Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 161-166, 2010a.

OJAGH, S. M. *et al.* Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 193-198, 2010b.

OOI, L. S. M. *et al.* Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* blume. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 34, n. 3, p. 511-522, 2006.

PALMA-GUERRERO, J. *et al.* Chitosan increases conidiation in fungal pathogens of invertebrates. **Applied Microbial and Biotechnology**, v. 87, n. 6, p. 2237-2245, 2010.

PALMA-GUERRERO, J. *et al.* Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 8, p. 585-594, 2009.

PALMA-GUERRERO, J. *et al.* Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 541-553, 2008.

PASTOR-NAVARRO, C. **Recubrimientos comestibles a base de hidroxipropil metilcelulosa: Caracterización y aplicación.** 2010. 219 f. Tese (Doutorado em Tecnología de Alimentos) - Universidad Politécnica de Valencia, España, 2010. Disponível em: <<http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/8534/tesisUPV3363.pdf>>. Acesso em: 1 sep. 2011.

PIQUERO, J. A. **Preparación y caracterización mecánica de hidrogeles de Quitosano para soporte de células de cartílago,** 2010. 50 f. Dissertação (Proyecto de Fin de Carrera) - Escuela Universitaria Ingeniería Técnica Industrial, Universidad de Zaragoza, España, 2010. Disponível em: <<http://zaguan.unizar.es/TAZ/EUITIZ/2010/5434/TAZ-PFC-2010-378.pdf>>. Acesso em: 31 ago. 2011.

- PONCE, A. G. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 2, p. 294-300, 2008.
- PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, n. 8, p. 859-865. Dec. 2005.
- QUINTERO, C. J.; FALGUERA, V.; MUÑOZ, H. A. Películas y recubrimientos comestibles y tendencias recientes em la cadena hortifrutícola. **Tumbaga**. Colombia, v. 5, p. 93-118. 2010.
- RAAFAT, D. *et al.* Insights into the mode of action of chitosan as na antibacterial compound. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3764-3773, 2008.
- RAMOS-GARCIA, M. de L. *et al.* Compuestos antimicrobianos adicionados em recubrimientos comestibles para uso em productos hortofrutícolas. **Revista Mexicana de Fitopatología**. Mexico, v. 28, n. 1, p. 44-57, 2010.
- RASOOLI, I. Food preservation- A biopreservative approach. **Food© Global Science Books**, v. 1, n. 2, p. 111-136, 2007.
- RAYBAUDI-MASSILIA, R. M. *et al.* Control of pathogenic and Spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 8, n. 3, p. 157-180, 2009a.
- RAYBAUDI-MASSILIA, R. M. *et al.* Shelf-life extension of fresh-cut “Fuji” apples at different ripeness stages using natural substances. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 2, p. 265-275, 2007.
- RAYBAUDI-MASSILIA, R. M. *et al.* Use of malic acid and quality stabilizing compounds to assure the safety of fresh-cut “Fuji” apples by inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Safety**, v. 29, n. 2, p. 236-252, 2009b.
- RAYBAUDI-MASSILIA, R. M. **Uso de sustancias antimicrobianas naturales en combinación con compuestos estabilizadores de la calidad para controlar microorganismos patógenos y extender la vida útil de frutas frescas cortadas**. 2007. 270f. Tese (Doctor em Tecnologia de alimentos dentro del programa “Sistemas Agrícolas, Forestales y Alimenticios”) -Universidad de Lleida, Cataluña-España, 2007. Disponível em: <<http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/8379/Trmrm1de1.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 16 jun. 2011.
- RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; MARTIN-BELLOSO, O. Edible alginate-based coating as carreir of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 3, p. 313-327, 2008.

- RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; MARTIN-BELLOSO, O. Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in fruit juices. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 7, p. 1579-1586, 2006.
- RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.
- RIVERO, M.A. *et al.* *Escherichia coli* Enterohemorrhagica y Síndrome Uremico Hemolítico em Argentina. Artículo especial. **Medicina**, Buenos Aires, v. 64, n. 4, p. 352-356, 2004.
- RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerate foods with microbial cultures – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 8, p. 276-284, 2001.
- ROJAS-GRAU, M. A. *et al.* Apple puree-alginate edible coating as Carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 2, p. 254-264, August 2007b.
- ROJAS-GRAU, M.A. *et al.* Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 3, p. 634-641, 2007a.
- ROJAS-GRAU, M.A. *et al.* Mechanical, barrier and antimicrobial properties of Apple puree edible films containing plant essential oils. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 24, p. 9262-9267, 2006.
- ROLLER, S.; COVILL, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and Apple. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 1-2, p. 67-77, 1999.
- ROMANAZZI, G. *et al.* Effects of pré-and Postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. **JFS: Food Microbiology and Safety**, v. 67, n. 5, p. 1862-1867, 2002.
- ROSS, A. I. V. *et al.* Combining nonthermal Technologies to control foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, n. 2-3, p. 125-138, 2003.
- RUIZ-CRUZ, S. *et al.* Aplicación de películas comestibles a base de quitosano y almidón para mantener la calidad sensorial y microbiológica de melón fresco cortado. **Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomedica –TOCTLI**, v. 1, p. 1-10, 2010.
- SÁNCHEZ-GONZÁLES, L. *et al.* Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 4, p. 443-452, jun 2010.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. *et al.* Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1302-1310, 2011.

SANGSUWAN, J.; RATTANAPANONE, N.; RACHTANAPUN, P. Effect of chitosan/methyl cellulose films on microbial and quality characteristics of fresh-cut cataloupe and pineapple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 403-410, 2008.

SÃO PAULO. Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo. **Manual de Doenças transmitidas por alimentos e água, Listeria Monocytogenes/Listeriose**. São Paulo, 2003. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/listeria.pdf>. Acesso em: 8 fev. 2012.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y-J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 2, p. 37-51, 1999.

SIGMA ALDRICH: Ficha de informações de segurança de produtos químicos: Trans-cinamaldeído 99%. Versão 5.0. Data de revisão 22 fev 2011. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 14 oct- 2011.

SILVA, N. da. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**, 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 632 p.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against Five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 118-122, 1998.

SOMMERS, C. H.; GEVEKE, D. J.; FAN, X. Inactivation of *Listeria innocua* on frankfurters that contain potassium lactate and sodium diacetate by flash pasteurization. **Journal Food Science**, v. 73, n. 2, p. M 72-74, 2008.

SRINIVASA, P. C.; THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan - Safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. **Food Reviews International**, v. 23, n. 1, p. 53-72, 2007.

TAPIA, M. S.; RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MARTIN-BELLOSO, O. M. Patógenos asociados a frutas frescas cortadas. Incidencia, supervivencia y crecimiento, brotes y control. *In: SIMPOSIUM "NUEVAS TECNOLOGIAS DE CONSERVACIÓN Y ENVASADO DE FRUTAS Y HORTALIZAS. VEGETALES FRESCOS CORTADOS."* La habana, Cuba. Marzo 2005. Disponível em: <http://www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/fotos/files_pdf/cuba/tapia.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2011.

TSAI, G. J. *et al.* Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. **Fisheries Science**, v. 68, n. 1, p. 170-177, 2002.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES. **Toxicology and carcinogenesis studies of trans-cinamaldehyde (Microencapsulated)**. United States, 2004, NTP TECHNICAL REPORT 514, NIH Publication N° 04-4448,. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr514.pdf>. Acesso em: 27 dec. 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. Biblioteca Universitaria. **Guia de normalização de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Ceará**. 2012. Disponível:

<http://www.biblioteca.ufc.br/images/stories/arquivos/bibliotecauniversitaria/guia_normalizacao_ufc_2012.pdf>. Acesso em: 30 ene. 2012.

VARGAS, M. *et al.* Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. **Postharvest Biology and Technology**, v. 41, n. 2, p. 164-171, 2006.

VARGAS, M. *et al.* Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 48, n.6, p. 496-511., 2008.

VELEZ-HARO, J. M. *et al.* Actividad antifúngica de Quitosano de diferente peso molecular sobre el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Aspergillus Níger*. In: VII CONGRESO DE NORESTE Y III CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS ALIMENTARIAS Y BIOTECNOLOGIA, Hermosillo, Sonora, 2010. Disponível em: <<http://www.congresodelnoroeste.uson.mx/memoriasdelcongreso/MT/MT-19.pdf>>. Acesso em: 1 sep. 2011.

WANG, L. *et al.* Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 23, p. 12411-12419, 2011.

WILES, J. L. *et al.* Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. **Food Engineering and Physical Properties**, v. 65, n. 7, p. 1175-1179, 2000.

XIANGYOU, W.; CONGCONG, Y.; ZHANLI, L. The research and application of edible coating Preservation. **Institute of Agricultural Engineering and Food Science**. China, p. 769-774, 2011.

XING, Y. *et al.* Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*capsicum annuum* L.). **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1443-1450, 2011.

YE, M.; NEETOO H.; CHEN H. Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 260-268, 2008.

ZHENG, L-Y.; ZHU, J-F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 3, p. 527-530, 2003.

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUFGHON, A. E. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 1, p. 45-51, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE D – Análise da variância dos experimentos

Análise de variância (ANOVA) para o experimento 1

Tratamentos	GL	Quadrado médio			
		Bactérias aeróbias mesófilas	Bactérias psicrófilas	Coliformes totais e <i>E. coli</i>	Bolores e leveduras
Tratamentos	2	18,16491206*	25,98836073*	1,18911000*	20,61704104*
Tempo de armazenamento	4	1,68998200*	9,72624469*	1,21683000*	9,72636365*
Tratamento x Tempo de armazenamento	8	0,80483766*	3,99190675*	1,2441000*	7,46880977*

Fonte: Própria do autor (2012).

* $P \leq 0,001$

Análises de variância (ANOVA) para o experimento 2

Tratamentos	GL	Quadrado médio
Tratamento	2	166,2344775*
Tempo de armazenamento	4	2,9069492*
Tratamento x Tempo de armazenamento	8	2,9428910*

Fonte: Própria do autor (2012).

* $P \leq 0,001$

Análise de variância (ANOVA) para o experimento 3

Tratamentos	GL	Quadrado médio
Tratamentos	2	145,6217508*
Tempo de armazenamento	4	15,6028179*
Tratamento x Tempo de armazenamento	8	3,9024842*

Fonte: Própria do autor (2012).

* $P \leq 0,001$